

Małgorzata Jelińska, Andrzej Tokarz, Joanna Brzóska

TŁUSZCZE DIETY A ZAWARTOŚĆ HETE I HODE W MIKROSOMACH WĄTROBOWYCH SZCZURÓW

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. ndzw. dr hab. *A. Tokarz*

Celem pracy było określenie wpływu olejów roślinnych, oleju rybnego oraz diety o zmniejszonej kaloryczności na zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych (5-, 12- i 15-HETE) oraz hydroksyoktadekadienowych (HODE) w mikrosomach wątrobowych szczurów. Zaobserwowano, że dieta wpływa na stężenie HETE i HODE, co należałoby brać pod uwagę w przypadku ich wykorzystywania jako biomarkerów stanów patologicznych.

Hasła kluczowe: HETE, HODE, kwas arachidonowy, kwas linolowy, dieta.
Key words: HETE, HODE, arachidonic acid, linoleic acid, diet.

Tłuszcze obecne w diecie należą do czynników w istotny sposób wpływających na funkcjonowanie organizmu człowieka. Szczególną uwagę zwracają tworzące je kwasy tłuszczowe, zwłaszcza wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT). Liczne badania epidemiologiczne wykazały, że wpływają one na pracę układu krążenia, wzrost i rozwój, procesy poznawcze, mogą nasilać lub hamować ryzyko rozwinięcia się miażdżycy, łuszczycy, alergii, czy choroby nowotworowej (1, 2, 3). Badania dotyczące roli obecnych w diecie kwasów tłuszczowych podejmują również próby wyjaśnienia mechanizmów wywołujących określone działania. Jednym z nich jest aktywność eikozanoidów powstających w różnych tkankach z 20-węglowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych pod wpływem cyklooksygenaz (COX) lub lipooksygenaz (LOX). Do najlepiej przebadanych eikozanoidów należą syntetyzowane przez COX metabolity kwasu arachidonowego – prostaglandyny E_2 i $F_{2\alpha}$, (PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$), prostacyklina I_2 , tromboksany, a także leukotrieny (m. in. LTB_4) będące produktami LOX. Zaobserwowano, że stężenie PGE_2 w tkankach dodatkowo koreluje z zawartością w diecie kwasu linolowego, który jest prekursorem kwasu arachidonowego. Dopiero w latach 80. zauważono, że aktywnością biologiczną odznaczają się również inne związki powstające pod wpływem lipooksygenaz z kwasu arachidonowego – kwasy hydroksyeikozatetraenowe (HETE), a także z kwasu linolowego – kwasy hydroksyoktadekadienowe (HODE). Wydaje się, że uczestniczą one w różnych procesach patologicznych takich, jak stany zapalne, astma, łuszczycy, miażdżycy czy choroby nowotworowe (4, 5, 6). W komórkach różnych typów nowotworów, m.in. prostaty, piersi, jelita grubego czy płuc zaobserwowano zwiększoną ekspresję 5- i 12-LOX, co wiązało się ze wzmożoną syntezą 5- i 12-HETE (7). Mogą one stymulować proliferację komórek nowotworowych i hamować ich apoptozę (8). 12-HETE ułatwiał również inwazyjność komórek nowotworowych, powstawanie przerzutów i angiogenezę (9).

W związku próbami wykorzystywania HETE i HODE jako biomarkerów zmian patologicznych, celem pracy było określenie wpływu olejów roślinnych, oleju rybnego oraz diety o zmniejszonej o połowę kaloryczności na zawartość kwasów 5-, 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych (5-, 12- i 15-HETE) oraz hydroksyoktadekadienowych (HODE) w mikrosomach wątrobowych szczurów.

MATERIAŁ I METODY

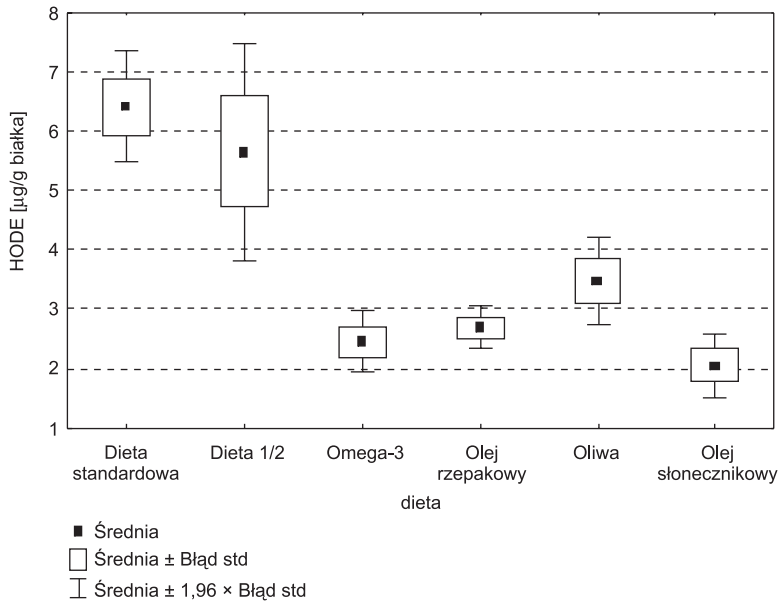
Badania prowadzono na samcach szczurów linii *Wistar* po uzyskaniu zgody Se-nackiej Podkomisji do Badań na Zwierzętach przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Zwierzęta podzielono na 6 grup, którym przez 6 tygodni począwszy od 70. dnia życia podawano dożołądkowo wybrany tłuszcz – olej rzepakowy, oliwę, preparat Omega-3 (Lysi) lub olej słonecznikowy – w ilości 0,4 cm³/dobę. Dwie grupy żywione były *ad libitum* wyłącznie paszą dla zwierząt Lab-H, przy czym jednej z nich podawano dietę o ograniczonej o połowę wartości odżywczej (grupa „dieta ½”). Po 6 tygodniach zwierzęta dekapitowano i pobierano wątroby, z których izolowano mikrosomy. HETE i HODE ekstrahowano na kolumnienkach Bakerbond C18 500 mg/3 cm³ (SPE) i oznaczano metodą HPLC na aparaturze firmy Shimadzu (pompa LC-10AS, detektor UV-VIS SPD-10AV), na kolumnie Nucleosil 100-5 C18, przy dł. fali 235 nm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu, wody i kwasu octowego (75:25:0,01) (10).

Zawartość 5-, 12- i 15-HETE oraz HODE w mikrosomach wątrobowych szczurów odczytywano z krzywych wzorcowych zależności pola powierzchni piku odpowiedniego kwasu od stężenia w przeliczeniu na g białka (µg/g białka). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program Statistica 9.0 PL i stosując testy nieparametryczne – jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) rang *Kruskala-Wallis*a oraz test korelacji *Spearmana*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

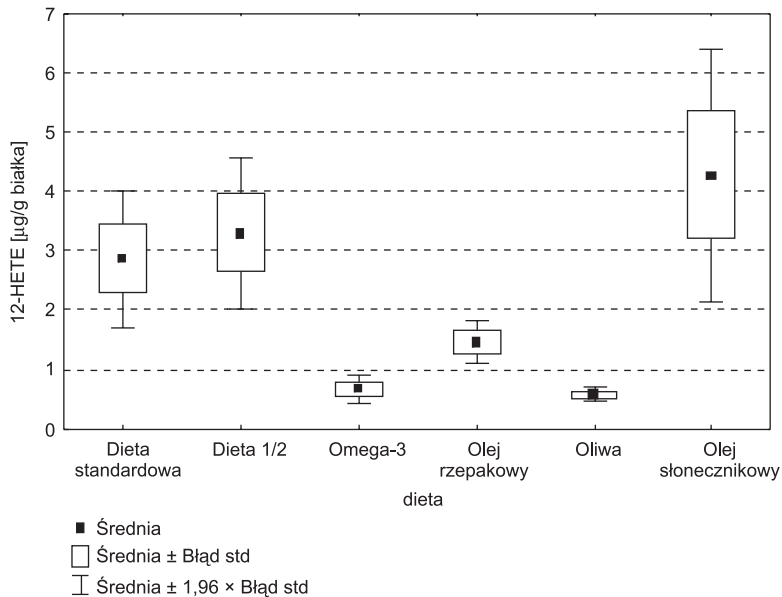
Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano, że spośród badanych związków w mikrosomach wątrobowych dominowały HODE i 12-HETE. Pozostałe izomery HETE (15- i 5-HETE) występowały w znacznie mniejszych ilościach.

Najwyższe stężenie HODE, ale także 15- i 5-HETE, wykryto w mikrosomach wątrobowych szczurów, żywionych wyłączenie paszą (dieta standardowa), w tym o ograniczonej o połowę kaloryczności (dieta ½) (ryc. 1). W przypadku HODE wartość ta wynosiła ok. 6 µg/g białka i była istotnie wyższa niż w grupach, którym podawano preparat Omega-3, olej rzepakowy lub słonecznikowy. O ile różnica ta wydaje się zrozumiała w przypadku mikrosomów uzyskanych od zwierząt, których dietę wzbogacano preparatem Omega-3 i olejem rzepakowym, co wynika z małej zawartości w nich kwasu linolowego, będącego prekursorem kwasu arachidonowego (odpowiednio 1,29% i 21,16%), o tyle w przypadku oleju słonecznikowego, który jest jednym z głównych źródeł kwasu linolowego (ok. 64%), wynik taki (2,05 µg HODE/g białka) jest zaskakujący. Jest to prawdopodobnie spowodowane szyb-



Ryc. 1. Zawartość HODE w mikrosomach wątrobowych szczurów karmionych różnymi dietami.

Fig. 1. HODE concentration in liver microsomes of rats fed various diets.



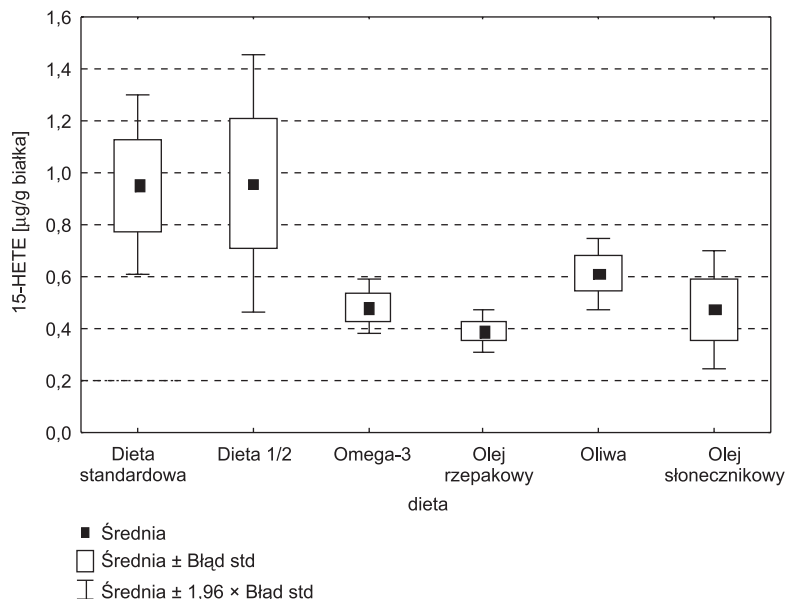
Ryc. 2. Zawartość 12-HETE w mikrosomach wątrobowych szczurów karmionych różnymi dietami.

Fig. 2. 12-HETE concentration in liver microsomes of rats fed various diets.

szym metabolizmem kwasu linolowego do arachidonowego w mikrosomach wątrobowych szczurów, którym podawano olej słonecznikowy, co odzwierciedla również wysoka zawartość 12-HETE w tej grupie.

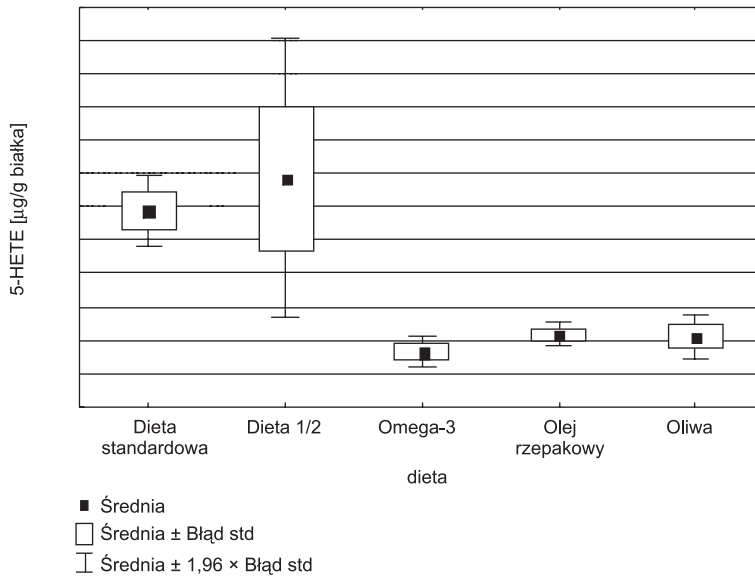
Najwyższe stężenie 12-HETE stwierdzono właśnie w mikrosomach wątrobowych szczurów, którym podawano olej słonecznikowy (4,28 $\mu\text{g/g}$ białka) (ryc. 2). Było ono istotnie wyższe niż w grupach, którym podawano preparat Omega-3 (0,66 $\mu\text{g/g}$ białka) lub oliwę (0,58 $\mu\text{g/g}$ białka), co wynika ze znacznie mniejszej zawartości kwasu linolowego w dietach tych grup. W przypadku kwasu 12-HETE stwierdzono, że istnieje istotna statystycznie, silna dodatnia korelacja ($r = 0,9$) między jego stężeniem w mikrosomach wątrobowych szczurów, a procentową zawartością kwasu linolowego w podawanym oleju. Stężenia 12-HETE w mikrosomach uzyskanych od zwierząt, którym nie podawano oleju utrzymywały się na podobnej wysokości (ok. 3 $\mu\text{g/g}$ białka) (ryc. 2). Były nieco niższe niż w grupie suplementowanej olejem słonecznikowym, choć istotnie wyższe w porównaniu do grup, otrzymujących preparat Omega-3 (ryc. 2.).

Pozostałe badane substancje – 15- i 5-HETE występowały w mikrosomach wątrobowych w kilkakrotnie niższych stężeniach (odpowiednio 0,96 $\mu\text{g/g}$ białka i 1,57 $\mu\text{g/g}$ białka) (ryc. 3 i 4). Wyraźnie widać, że zastosowanie diety wzbogaconej olejem rzepakowym, oliwą, preparatem Omega-3, ale także olejem słonecznikowym wiąże się ze zmniejszeniem ich zawartości w mikrosomach wątrobowych szczurów. Potwierdzają to także inne badania (11). W przypadku zwierząt, którym podawano preparat Omega-3 niskie stężenia zarówno HODE, jak i wszystkich izomerów HETE wynikają z obecności w tym oleju WNKT z rodziny n-3 – kwasu eikozapen-



Ryc. 3. Zawartość 15-HETE w mikrosomach wątrobowych szczurów karmionych różnymi dietami.

Fig. 3. 15-HETE concentration in liver microsomes of rats fed various diets.



Ryc. 4. Zawartość 5-HETE w mikrosomach wątrobowych szczurów karmionych różnymi dietami.

Fig. 4. 5-HETE concentration in liver microsomes of rats fed various diets.

taenowego (EPA, 18%) i dokozaheksaenowego (DHA, 12%). EPA konkuruje z kwasem arachidonowym o dostępność enzymów, m.in. LOX, co powoduje zmniejszenie syntezy metabolitów kwasu arachidonowego, w tym HETE i nasilenie syntezy pochodnych EPA (12).

Zastosowanie diety o obniżonej kaloryczności (dieta 1/2) nie powoduje zmian w zawartości HETE lub HODE w stosunku do grupy karmionej wyłącznie paszą (dieta standardowa), co wydaje się zaskakujące ze względu na zmniejszoną w diecie ilość kwasów tłuszczowych, także linolowego.

Uzyskane wyniki wskazują, że dieta ma znaczący wpływ na zawartość HETE i HODE, co należałoby brać pod uwagę w przypadku ich ewentualnego wykorzystywania jako biowskaźników stanów patologicznych.

M. Jelińska, A. Tokarz, J. Brzóska

DIETARY FAT AND HETE AND HODE CONCENTRATION IN RAT LIVER MICROSOMES

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of vegetable oils, fish oil as well as a diet of nutritional value reduced by half on the concentration of 5-, 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic acids (HETE) (arachidonic acid lipoxygenase metabolites) and hydroxyoctadecadienoic acids (HODE) (linoleic acid metabolites) in rat liver microsomes. HETE and HODE have been discovered to play a role in some pathological processes, such as atherosclerosis, psoriasis as well as cancers of lung, breast, colon or prostate. Liver microsomes of male Wistar rats were used in the study. The animals divided into 6 groups were fed intragastrically 0.4 ml of one of the oil daily (olive, rapeseed, sunflower oil or Lysi's Omega-3 Fish Oil).

Two groups were fed animal fodder only ad libitum, of which one received a diet of nutritional value reduced by a half. HETE and HODE were isolated with the SPE method and determined by HPLC. Results were expressed in $\mu\text{g/g}$ of protein. 12-HETE and HODE were major metabolites in rat liver microsomes. It was observed that the concentration of each compound was affected by the diet, which suggests that they can be considered for use as biomarkers of pathological changes. The diet of nutritional value reduced by a half did not change HETE and HODE amounts in liver microsomes.

PIŚMIENNICTWO

1. *Vanden Heuvel J.P.*: Cardiovascular disease-related genes and regulation by diet. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2009; 6: 448-455. – 2. *Immis S.M.*: Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res.*, 2008; 1237:35-43. – 3. *Chapkin R.S., Kim W., Lupton J.R., McMurray D.N.*: Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids*, 2009; 81: 187-191. – 4. *Profita M., Sala A., Riccobono R., Paterno A., Mirabella A., Bonanno A., Guerrero D., Pace E., Bonsignore G., Bousquet J., Vignola A.M.*: 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000; 105: 711-716. – 5. *González-Núñez D., Claria J., Riviera F., Poch E.*: Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 2001; 37: 334-338. – 6. *Spindler S.A., Sarkar F.H., Sakr W.A., Blackburn M.L., Bull A.W., LaGattuta M., Reddy R.G.*: Production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) by prostate tumors and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 239: 775-781. – 7. *Jiang W.G., Douglas-Jones A., Mansel R.E.*: Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids*, 2003; 69: 275-281. – 8. *Tong W.G., Ding X.Z., Adrian T.E.*: The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 296: 942-948. – 9. *Nie D., Nemeth J., Qiao Y., Zacharek A. Li L., Hanna K., Tang K., Hillman G.G., Cher M.L., Grignon D.J., Honn K.V.*: Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 657-663. – 10. *Frohberg P., Drutkowski G., Wobst J.*: Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 41: 1317-1324. – 11. *Surette M.E.M., Whelan J., Gouping L.U., Ingibjorg H., Kindella J.E.*: Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modify Syrian hamster platelet and macrophage phospholipid fatty acyl composition and eicosanoid synthesis: a controlled study. *Biochim. Biophys. Acta/Lipids and Lipid Metabolism*, 1995; 15: 392-401. – 12. *James M.J., Bibson R.A., Cleland L.G.*: Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 343S-348S.

Adres: 02-097 Warszawa, Banacha 1.