

Agnieszka Bialek, Andrzej Tokarz, Paweł Zagrodzki¹⁾

WPLYW SPRZĘŻONYCH DIENÓW KWASU LINOŁOWEGO W DIECIE SAMIC SZCZURÓW NA RYZYKO PROCESU NOWOTWOROWEGO U ICH POTOMSTWA*

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

¹⁾ Zakład Bromatologii Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: dr hab. P. Zagrodzki

W pracy zbadano wpływ suplementacji diety samic szczurów sprzężonymi dienami kwasu linolowego na efektywność indukcji procesu nowotworowego u ich potomstwa. Zaobserwowano, że CLA wykazuje działanie ochronne w kontekście zapadalności na nowotwory sutka u zwierząt potomnych. Zbadano ponadto wpływ zastosowanej modyfikacji diety na poziomy wybranych cytokin: IL-6 i TNF- α .

Hasła kluczowe: sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), gruczolakorak, cytokiny, karcinogeneza.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), adenocarcinoma, cytokines, carcinogenesis.

Prawidłowe żywienie odgrywa szczególną rolę jako jeden z czynników warunkujących stan zdrowia. Szczególnie dieta kobiet w okresie rozrodczym, planujących potomstwo, ciężarnych jak i karmiących jest niezwykle istotna dla prawidłowego rozwoju dziecka jak i dla jego późniejszego stanu zdrowia (1, 2). Do grupy związków mających istotne znaczenie w prewencji licznych schorzeń związanych z dietą można zaliczyć sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA – ang. Conjugated Linoleic Acid). Liczne badania wskazują na ich mnogie efekty prozdrowotne, spośród których szczególnie cenne wydają się być ich właściwości przeciwnowotworowe (3). Naturalnym źródłem sprzężonych dienów kwasu linolowego jest mleko. Związki te, obecne w wydzielinie gruczołów mlecznych różnych gatunków ssaków, przyczyniają się m. in. do efektywniejszego wykorzystania pokarmu przez organizmy potomne. Jednym z czynników decydujących o zawartości CLA w mleku kobiet karmiących jest m.in. obecność tych składników w diecie matek, co jednocześnie wydaje się być najlepszym sposobem zapewnienia ich odpowiedniej podaży w diecie potomstwa już od chwili urodzenia (4).

Celem badań było określenie wpływu suplementacji diety samic szczurzych preparatem zawierającym sprzężone dieny kwasu linolowego na powstawanie i rozwój indukowanych chemicznie nowotworów sutka u ich potomstwa oraz poszukiwanie zależności pomiędzy zastosowaną modyfikacją diety, a poziomami tych kwasów tłuszczowych i wybranych cytokin w surowicy krwi.

* Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego promotorskiego nr N N405 362137 finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i projektu młodego badacza WUM nr FW12/WB1/10.

MATERIAŁ I METODY

Dla prowadzonych badań uzyskano akceptację Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta (szczury szczepu *Sprague-Dawley*), pochodziły z Pracowni Zwierząt Laboratoryjnych Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej WUM. Miały one zapewniony ciągły dostęp do wody i paszy (pasza hodowlana Labofeed H) oraz przebywały w pomieszczeniu o stałej wilgotności i temp. (23 °C), w którym zachowano 12-godz. cykl światła i ciemności. Samice zostały losowo przyporządkowane do jednej z dwóch grup eksperymentalnych, z których grupa kontrolna (K) otrzymywała olej roślinny, a grupa badana (O) preparat zawierający CLA - Bio-C.L.A. (Pharma Nord Denmark) w ilości 0,15 cm³/dzień. Suplementacja była prowadzona przez 10 dni przed pierwszym kojarzeniem, podczas ciąży i karmienia, aż do momentu odłączenia potomstwa w 30 dniu życia. Dieta samców nie była w żaden sposób modyfikowana. Z uzyskanego potomstwa w dalszym eksperymencie zostały wykorzystane jedynie samice. Samice potomne, pochodzące zarówno od grupy kontrolnej jak i badanej, zostały w obrębie stosowanych grup suplementacji losowo podzielone na dwie grupy, z których jedna była dalej suplementowana odpowiednio olejem roślinnym (K1) lub preparatem CLA (O1) w ilości 0,15 cm³/dzień, zaś druga (K2, O2) spożywała standardową dietę (pasza hodowlana Labofeed H) i wodę w ilości *ad libitum*. Proces nowotworowy był wywoływany poprzez podanie 7,12-dimetylobenz[a]antracenu w 50 dniu życia w ilości 80 mg/kg masy ciała. Masa ciała zwierząt była oceniana co tydzień. Zwierzęta były ponadto co tydzień sprawdzane palpacyjnie w celu stwierdzenia pojawiania się, lokalizacji i wielkości guzów.

Oznaczanie zawartości sprzężonych dienów kwasu linolowego przeprowadzono techniką chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną. Do badań wykorzystano surowicę pozyskaną poprzez odwirowanie przy 3000 rpm w temperaturze 4 °C przez 10 min krwi świeżo pobranej podczas dekapitacji w 21 tygodniu eksperymentu. Z surowicy pochodzącej od jednego szczura wykonano trzy równoległe oznaczenia. Estrы metylowe kwasów tłuszczowych przygotowano wg procedury zaproponowanej przez *Bondia-Pons* i współpr. (5) w modyfikacji własnej. Warunki analizy opisano uprzednio (6).

Zawartość TNF- α i IL-6 w surowicy szczurów oznaczano metodą ELISA. W tym celu wykorzystano testy Rat TNF- α /TNFSF1A i Rat IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA).

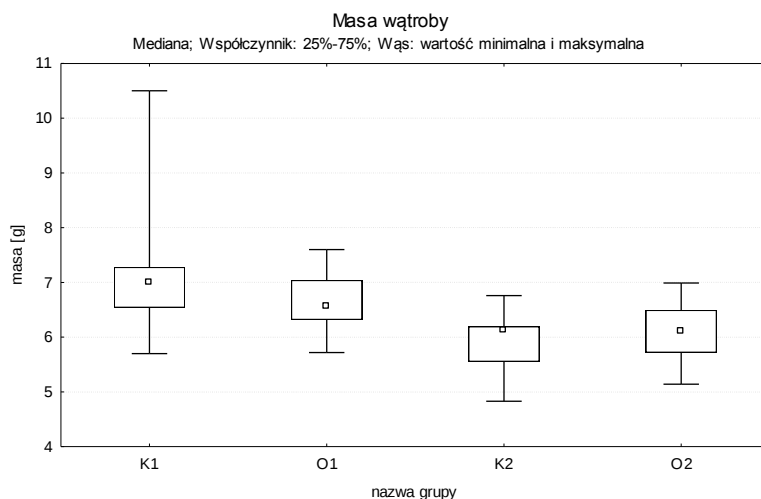
Istotność różnic wartości median dla poszczególnych parametrów w różnych grupach szczurów sprawdzono testem nieparametrycznym *Kruskala-Wallisa*. Wyniki uzyskane tym testem zostały zweryfikowane testem *Dunna*. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu GraphPad Prism v.3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) oraz z wykorzystaniem pakietu Statistica 9.0 PL (StatSoft, Polska). Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $p = 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Celem prowadzonej suplementacji było zapewnienie zwiększonej zawartości sprężonych dienów kwasu linolowego w mleku matek, a co za tym idzie wczesnego zwiększonego pobrania tych związków z dietą przez potomstwo.

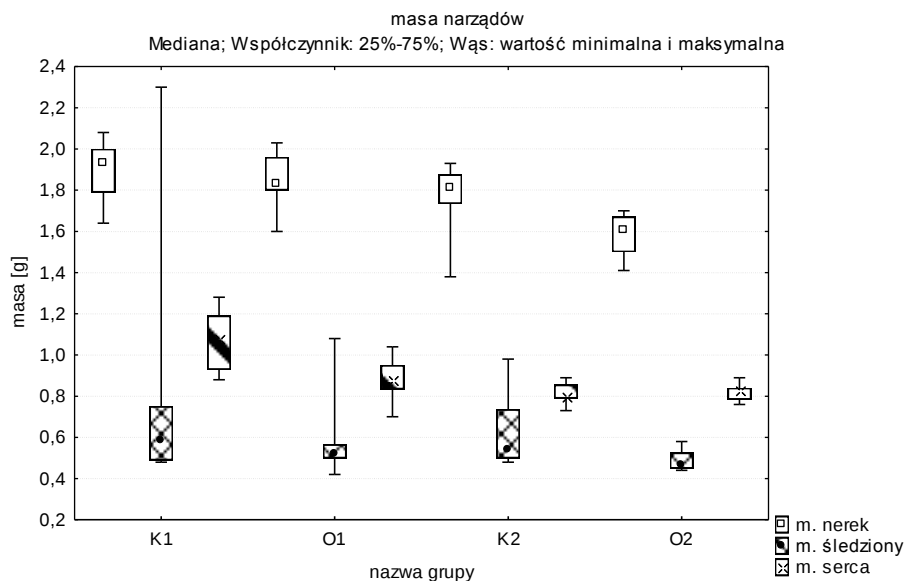
Podanie czynnika kancerogennego inicjowało we wszystkich grupach badanych powstawanie guzów sutka, które w badaniu histopatologicznym zostały zidentyfikowane jako gruczolakoraki. U potomstwa matek otrzymujących preparat zawierający CLA obserwowano jednak znacznie mniejszą zapadalność na nowotwory w porównaniu do potomstwa grupy suplementowanej wyłącznie olejem. W grupie O1 u dwóch spośród ośmiu zwierząt wystąpiły guzy nowotworowe (zapadalność - 25%) a w grupie O2 - trzy spośród dziewięciu zwierząt rozwinęły guzy (zapadalność - 33%), podczas gdy w grupie K1 aż u ośmiu spośród dziesięciu zwierząt (zapadalność - 80%), a w grupie K2 - u siedmiu spośród dziewięciu osobników (zapadalność - 78%), pojawiły się nowotwory sutka. Podobne hamowanie procesu karcinogenezy obserwowaliśmy we wcześniejszym eksperymencie (7).

Uzyskane wyniki wskazują na występowanie istotnych różnic w masie poszczególnych narządów pomiędzy badanymi grupami (ryc. 1 i ryc. 2, tab. I). Suplementacja CLA nie wpływała jednak istotnie na masę wątroby, co jest zgodne z naszymi wcześniejszymi wynikami (7) jak i z wynikami uzyskanymi przez inny autorów (8).



Ryc. 1. Porównanie mas wątrób badanych grup dietetycznych.

Fig. 1. Comparison of livers weights of experimental dietary groups.



Ryc. 2. Porównanie mas narządów badanych grup dietetycznych.

Fig. 2. Comparison of organs weights of experimental dietary groups.

Tabela 1. Wyniki testu *Dunna* dla parametrów: masa wątroby, masa nerek, masa śledziony, masa serca, udział izomerów CLA w puli kwasów tłuszczowych w surowicy*

Table 1. *Dunn's* test results for the parameters: weight of livers, kidneys, spleens, hearts, share of CLA isomers in fatty acids pool of experimental groups*

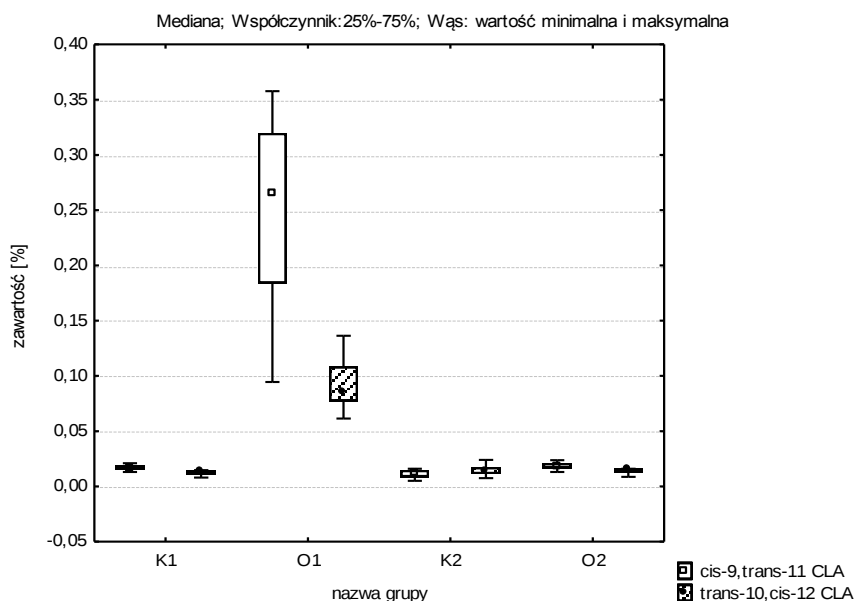
Parametr	Porównywane grupy szczurów	Różnice pomiędzy sumami rang	Poziom istotności statystyki Dunna
masa wątroby	K1 vs K2	14,88	$P < 0,05$
masa nerek	K1 vs O2	16,93	$P < 0,01$
	O1 vs O2	13,90	$P < 0,05$
masa serca	K1 vs K2	15,57	$P < 0,01$
	K1 vs O2	15,40	$P < 0,05$
masa śledziony	K2 vs O2	13,22	$P < 0,05$
Kwas <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -oktadekadienowy	K1 vs O1	-15,88	$P < 0,01$
	O1 vs K2	22,25	$P < 0,001$
	O1 vs O2	12,99	$P < 0,05$
Kwas <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 oktadekadienowy	K1 vs O1	-18,61	$P < 0,001$
	O1 vs K2	17,94	$P < 0,01$
	O1 vs O2	14,56	$P < 0,05$

* podano tylko wyniki istotne statystycznie.

* only significant results.

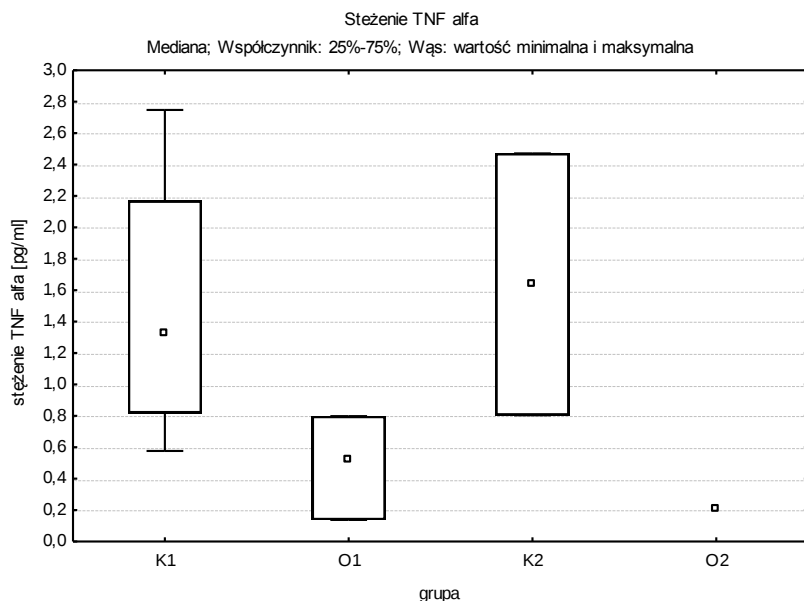
W zastosowanym przez nas suplemencie diety stwierdzono obecność dwóch izomerów CLA: kwasów *trans*-10, *cis*-12 i *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego, których wzajemny stosunek wynosił 1:1. Ich udział w całkowitej puli kwasów

tłuszczowych był znaczny, gdyż stanowiły one odpowiednio ok. 33% i 31%. W surowicach grup badanych stwierdzono, co prawda, obecność obu tych kwasów tłuszczowych, jednak udział izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA był zdecydowanie większy, co jest zgodne zarówno z naszymi wcześniejszymi obserwacjami (7) jak i pracami innych autorów (9, 10). Najwyższe, istotnie wyższe poziomy kwasu żwaczowego, stwierdzono w grupie O1, podczas gdy udział tego związku w surowicach pozostałych grup nie różnił się (ryc. 3, tab. I). Podobną zależność obserwowano w przypadku izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA (ryc. 3, tabela I). W obrębie grupy O1 porównano ponadto zawartość kwasu żwaczowego pomiędzy osobnikami, u których wystąpiły lub nie wystąpiły guzy. U osobników, u których podanie czynnika kancerogennego nie spowodowało w czasie trwania eksperymentu wystąpienia guzów nowotworowych, obserwowano wyższą zawartość kwasu żwaczowego w surowicy w porównaniu do osobników, u których guzy wystąpiły ($5,5 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ w porównaniu do $3,5 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Podobną zależność obserwowano we wcześniejszym eksperymencie (7).



Ryc. 3. Udział kwasu *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego i *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowego w puli kwasów tłuszczowych w badanych grupach dietetycznych.

Fig. 3. Share of *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoate and *trans*-10, *cis*-12 octadecadienoate in fatty acids pool of experimental groups.



Ryc. 4. Zawartość TNF- α w surowicy krwi badanych grup dietetycznych.

Fig. 4. Content of TNF- α in serum of experimental groups.

Poziomy obu cytokin oznaczonych w surowicy krwi grup eksperymentalnych były bardzo niskie. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach TNF- α (ryc. 4) i IL-6 pomiędzy badanymi grupami, choć uzyskane wyniki wskazują na istnienie tendencji do obniżania poziomów TNF- α w grupach O1 i O2, co wydaje się być związane ze stosowaniem suplementacji diety preparatem CLA. Podobne rezultaty uzyskali inni badacze, zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych jak i *in vitro* (11-13).

WNIOSKI

Ochronne działanie kwasu żwaczowego, potwierdzone jego zwiększoną ilością (o ok. 50%) u szczurów, stymulującą zdolność do obrony przed czynnikiem kancerogennym, świadczy o tym, że związek ten jest bardzo pożądany w diecie od jak najwcześniejszego okresu życia.

A. Bialek, A. Tokarz, P. Zagrodzki

INFLUENCE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN THE DIET OF RATS FEMALES AT RISK OF CANCER IN THEIR OFFSPRING

Summary

This study investigated the influence of CLA supplementation of the diet of rat females at formation and development of chemically induced breast cancer in their offspring and the search for a relationship between diet and these fatty acids and cytokines content in serum. Animals were randomly divided into two groups of different dietary supplementation (oil or Bio-C.L.A. (Pharma Nord Denmark)). Female offspring, which were treated with carcinogenic agent, were within those dietetic groups randomly divided into two groups: one – supplemented with oil (K1) or CLA (O1) and second fed with standard diet (Labofeed H) and water *ad libitum*. Fatty acid analysis was made with GC with capillary column and flame-ionization detection. TNF- α and IL-6 content was made with ELISA. CLA supplementation decreased the incidence of tumors. *Cis*-9, *trans*-11 CLA was the main isomer in plasma of groups receiving Bio-C.L.A. The highest, significantly higher levels of rumenic acid were found in O1 group, whereas the content of this compound in other groups did not differ. In O1 group the levels of rumenic acid were higher in those individuals without tumors ($5.5 \pm 3.6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) than in those with tumors ($3.5 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). The levels of both cytokines - TNF- α and IL-6 were very low in all investigated groups. We observed the tendency of reduction of TNF- α in both CLA supplemented groups. The proper supply of conjugated linoleic acid in the diet is extremely significant from the earliest period of life.

PIŚMIENNICTWO

1. Mrzygłód S.: Wpływ odżywiania matki na rozwój płodu. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2007; 88: 402-407.-2. Sochacka-Tatara E., Florek M., Mosio A.: Żywnienie młodych kobiet w okresie poprzedzającym ciążę – badania w Krakowie 2000-2004. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 2006; 87: 112-117.- 3. Kelley N. S., Huang Y. W.: Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr.*, 2007; 137: 2599-2607.- 4. Bialek A., Tokarz A., Romanowicz M.: The impact of selected factors on *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoate content in milk of breastfeeding women. *Probl. Hig. Epidemiol.*, (zgłoszona do druku).- 5. Bondia -Pons I., Molto-Puigmarti C., Castellote A. I., Lopez-Sabater M. C.: Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by gas chromatography. *J. Chromat. A*, 2007; 1157: 422– 429.- 6. Bialek A., Tokarz A., Kazimierska W., Bielecki W.: Wpływ suplementacji diety CLA na profil kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 3: 314-322.- 7. Bialek A., Tokarz A., Dudek A., Kazimierska W., Bielecki W.: Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors. *Lipids in Health and Disease*, 2010; 9: 126.- 8. Maślak E., Kostogrys R. B., Pisulewski P. M.: Wpływ sprężonych dienów kwasu linolowego (CLA) na masę i zmiany histologiczne wątroby oraz poziom triacyloglicerole u szczurów żywionych dietą wysokofruktozową. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009; 3: 1052-1056.- 9. Zlatanos S.N., Laskaridis K., Sagredos A.: Conjugated linoleic acid content of human plasma, *Lipids in Health and Disease*, 2008; 7: 34-39.- 10. Burdge G.C., Lupoli B., Russell J.J., Tricon S., Kew S., Banerjee T., Shingfield K.J., Beever D.E., Grimble R.F., Williams C.M., Yaqoob P., Calder P.C.: Incorporation of *cis*-9,*trans*-11 or *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid into plasma and cellular lipids in healthy men. *J. Lipid Res.*, 2004; 45: 736-741.- 11. Hernandez-Diaz G., Alexander-Aguilera A., Araba-Villalba A., Soto-Rodriguez I., Garcia H. S.: Effect of Conjugated Linoleic Acid on body FAT, tumor necrosis factor alpha and resistin secretion in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010; 82: 105-109.- 12. Soffi F., Buccioni A., Cesari F., Gori A. M., Minieri S., Mannini L., Casini A., Gensini G. F., Abbate R., Antongiovanni M.: Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and hemorheological variables: A dietary intervention study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2010; 20: 117-124.- 13. Yang M., Cook M. E.: Dietary Conjugated Linoleic Acid Decreased Cachexia, Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production, and Modifies Splenocyte Cytokines Production. *Ex. Biol. Med.*, 2003; 228: 51-58.