

WPŁYW IZOMERÓW SPRZEŻONEGO KWASU LINOŁOWEGO NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH PIERSI

EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS ON PROLIFERATION OF MAMMARY CANCER CELLS

Aneta Koronowicz¹, Joanna Dulińska-Litewka², Paweł Pisulewski¹, Piotr Laidler²

¹Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy, Kraków

²Katedra Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum, Kraków

Słowa kluczowe: sprzeżony kwas linolowy (CLA), cis9,trans11-CLA, trans10,cis12-CLA, rak piersi, proliferacja
Key words: conjugated linoleic acid (CLA), cis9,trans11-CLA, trans10,cis12-CLA, breast cancer, cell proliferation

STRESZCZENIE

Sprzeżony kwas linolowy (ang. conjugated linoleic acid - CLA) jest terminem zbiorczym obejmującym grupę pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego, w których występują sprzeżone wiązania podwójne. Spośród tych związków szczególnie zainteresowanie budzi aktywność izomerów cis9,trans11 i trans10,cis12. Omawiane izomery występują naturalnie w tłuszczu mleka i mięsa przeżuwaczy, z dominującym udziałem izomeru cis9,trans11 (kwasu żwaczowego). Wyniki licznych prac wskazują na przeciwnowotworowe właściwości izomerów CLA, m.in. na ich zdolność do hamowania wzrostu różnych linii komórek nowotworowych *in vitro*. Jednocześnie wskazują na odmienne mechanizmy przeciwnowotworowego oddziaływania różnych izomerów CLA. Celem niniejszych badań była ocena indywidualnego wpływu naturalnie występujących izomerów CLA tj. cis9, trans11 i trans10,cis12 na proliferację ustabilizowanych linii komórek nowotworowych piersi. Badania przeprowadzono na dwóch hormonozależnych ludzkich liniach nowotworowych piersi: MCF-7 i T47D (ATCC Collection). Komórki inkubowano z izomerami CLA: cis9,trans11 lub trans10,cis12 w zakresie stężeń 5 - 200 µM i czasie 24 - 120 godzin. W zakresie stężeń 5 - 100 µM nie obserwowano cytotoksycznego wpływu izomerów CLA na komórki w teście LDH (ang. Lactic Dehydrogenase; Roche) i w tym zakresie stężeń badano proliferację komórek. Wpływ izomerów CLA na proliferację komórek określono poprzez ich barwienie fioletem krystalicznym oraz z wykorzystaniem testu ELISA BrdU (5'-bromo-2'-deoksyurydyna), opartym na wbudowywaniu się BrdU do DNA proliferujących komórek. Z uzyskanych wyników można wnioskować, że obydwa zastosowane izomery CLA działają hamująco na proliferację komórek linii MCF-7 i T47D szczególnie po czasie dłuższym niż 48 godzin. Komórki linii T47D odpowiadające ~65 % obniżeniem proliferacji wydają się być bardziej wrażliwe na działanie izomerów CLA.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term describing a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with two conjugated double bonds. Among these compounds two isomers cis9,trans11 and trans10,cis12 have received considerable attention. They are present in milk and meat fat of ruminants and the cis9,trans11 (rumenic acid) is the most abundant with lesser amounts of the trans10, cis12 isomer. A considerable number of papers suggest anticarcinogenic properties of CLA, including their ability to suppress the growth of different cancer cell lines *in vitro*. It was also found that these isomers may act through different mechanisms to inhibit carcinogenesis. In view of the above, the objective of this paper was evaluation of isomer-specific effects of the natural CLA isomers i.e. cis9,trans11 and trans10,cis12 on proliferation of mammary cancer cell lines. Two mammary cancer cell lines were used: MCF-7 and T47D (ATCC Collection). The cells were incubated with both CLA isomers: cis9,trans11 or trans10,cis12 within the range of 5 - 200 µM for 24 - 120 h. There were no toxic effects of any of the isomers in the range of 5 - 100 µM, as indicated by the Cytotoxicity Detection Kit (Roche) and cells proliferation was determined in these experimental conditions. Proliferation of cells was determined using Cell Proliferation ELISA BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine), based on incorporation of BrdU to DNA of growing cells. The results obtained indicate that both isomers suppress the proliferation of the studied mammary cancer cell lines i.e. MCF-7 and T47D, especially when treated with the CLA isomers for 48 h or longer. Of the studied lines the strongest growth-suppressing function ~65 % was observed for the line T47D.

Adres do korespondencji: Aneta Koronowicz, Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy, 31-149 Kraków, ul. Balicka 122, tel. 012 6624819, fax 012 6624812, e-mail: amaster@ar.krakow.pl

WSTĘP

Choroby nowotworowe są drugim co do liczebności przypadków typem chorób cywilizacyjnych, a wśród nich rak piersi stanowi główną przyczynę zgonów kobiet w Polsce i na świecie [27]. Rak piersi może się rozwijać na skutek nagromadzonych mutacji w genach regulujących cykl komórkowy, powodując upośledzenia jego kontroli i jest przyczyną patologii, która prowadzić może do transformacji nowotworowej. Nowotworzenie jest długotrwałym procesem zachodzącym w wyniku niekontrolowanego namnażania się komórek (prolifracja), zahamowania różnicowania i apoptozy. Spośród wielu czynników zmniejszających ryzyko wystąpienia nowotworu, szczególną rolę przypisuje się niezbędnym nienasyconym kwasom tłuszczowym (szczególnie *n-3* NNKT), a także izomerom sprzężonego kwasu linolowego (CLA), które charakteryzują prozdrowotne oddziaływanie na organizm człowieka [19]. Izomery te są syntetyzowane w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy, a następnie wbudowywane do tłuszczu mleka i tkanki tłuszczowej tych zwierząt [5]. Wyodrębniono 8 izomerów CLA różniących się od siebie pozycją wiązań podwójnych w łańcuchu [15]. W składnikach diety obecne są głównie izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12* [2], przy czym *cis9,trans11* przeważa ilościowo i stanowi 70-90% ogólnej puli CLA obecnych w tłuszczu mleka i 60-85% ogólnej puli CLA występujących w tłuszczu mięsa przeżuwaczy [5, 18].

Pierwsze informacje na temat potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych CLA pojawiły się pod koniec lat 70-tych [17], a następnie potwierdzone zostały w szeregu badań *in vitro* [3, 7] i *in vivo* [8, 23]. Ponadto, przeprowadzone badania epidemiologiczne w Finlandii wykazały korzystną ujemną korelację pomiędzy spożywaniem mleka (źródło izomeru *cis9,trans11*-CLA) a zapadalnością wśród kobiet na raka piersi [10].

Celem niniejszych badań była ocena indywidualnego wpływu naturalnie występujących izomerów CLA tj. *cis-9,trans-11* i *trans-10,cis-12* na proliferację ustabilizowanych linii komórek nowotworowych piersi. Proces proliferacji ściśle koreluje z regulacją cyklu komórkowego, stopniem rozwoju nowotworu oraz wielkością zmian obejmujących daną tkankę [12].

MATERIAŁ I METODY

Hodowla komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe linii MCF-7 i T47D (ATCC Collection, USA) hodowano odpowiednio w medium: MEM i RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), w obecności 10% FBS (Gibco), antybiotyku (Sigma-Aldrich) [100 µg/ml], pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich) [110 mg/L] i insuliny (Sigma-Aldrich) [0,01 mg/ml]. Komórki hodowano

na szalkach 100 (BD Biosciences) w warunkach hodowli komórkowej (37°C, 5% CO₂). Do eksperymentu używano komórki maksymalnie po 6-7 pasażach.

Izomery sprzężonego kwasu linolowego (CLA)

Izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12* (Nu-Prep, USA) przygotowano w formie 100 mM roztworów w etanolu (POCH, Polska) i przechowywano w temperaturze -20°C.

Sposób przeprowadzenia badań

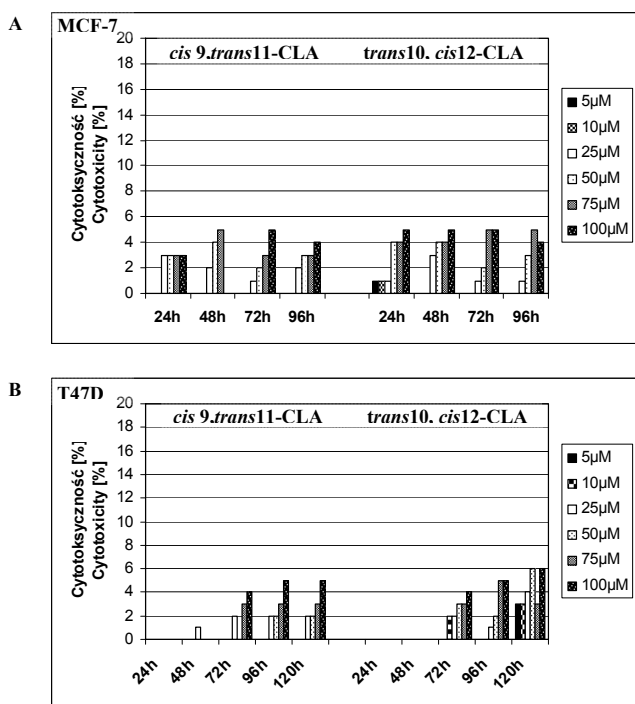
Komórki wysiewano na 96-dółkowe płytki hodowlane (BD Biosciences) w ilości 5x10³/dółek. Po 24 godzinach od wysiania pożywkę standardową wymieniano na pożywkę z indywidualnymi izomerami CLA o końcowym ich stężeniu: 5, 25, 50, 75, 100 µM (w 0,1 % etanolu). Hodowlę kontynuowano przez 24, 48, 72, 96 i 120 godzin, wymieniając codziennie pożywkę z izomerami CLA. Próbę kontrolną stanowiły komórki hodowane w medium z FBS oraz w medium z FBS i 0,1% etanolem.

Ocena cytotoksyczności badanych czynników

Wpływ izomerów CLA na żywotność komórek oznaczano w zakresie badanych stężeń po 24, 48, 72, 96, 120 godzinach, przy użyciu zestawu do badania cytotoksyczności (Cytotoxicity Detection Kit LDH - Roche) poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej z cytoplazmy do pożywki hodowlanej w wyniku lizy komórek. Do 100 l pożywki pobranej z komórek, dodawano 100 l substratu, mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Stężenie produktu określano mierząc absorbancję przy długości fali 490 nm. Doświadczenia wykonano w czterech powtórzeniach, w trzech niezależnych eksperymentach. Uzyskane wyniki wpływu badanych izomerów CLA na żywotność komórek przedstawiono na Ryc. 1 jako cytotoksyczność obliczoną wg wzoru: Cytotoksyczność [%] = (pożywka badana-kontrola niska) / (kontrola wysoka- kontrola niska) 100. Jako niską kontrolę zastosowano pożywkę (pożywka standardowa - RPMI lub MEM z 10 % FBS) z komórek hodowanych w czasie 24 - 120 godzin w standardowej pożywce, a kontrolę wysoką pożywkę z komórek traktowanych przez 2 godziny 1 % roztworem Tritonu.

Badanie proliferacji komórek

Prolifrację komórek nietraktowanych (kontrola - komórki w pożywce MEM lub RPMI 1640 + 10 % FBS) i komórek traktowanych izomerami CLA, w czasie 24, 48, 72, 96 i 120 godzin badano poprzez: 1) oznaczenie ilości wbudowanej 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) do DNA proliferujących komórek; 2) barwienie komórek fioletem krystalicznym.



Ryc. 1 Cytotoksyczny wpływ *cis9,trans11-CLA* i *trans10,cis12-CLA* na komórki A. MCF-7 i B. T47D. Oznaczenie wykonano testem Cytotoxicity Detection (LDH) Kit i przedstawiono jako średnią z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w czterech powtórzeniach
Cytotoxic effect of *cis9,trans11-CLA* and *trans10,cis12-CLA* on cells A. MCF-7 and B. T47D. The data/results were determined with the use Cytotoxicity Detection (LDH) Kit and given as means from three separate experiments conducted in four trials

Oznaczenie z wykorzystaniem zestawu BrdU

Komórki wysiewano na 96 dołkową szalkę w ilości 5×10^3 /dołek. Po 24 godzinach od wysiania, pożywkę standardową wymieniano na pożywkę z odpowiednimi stężeniami CLA i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 - 120 godzin, wymieniając codziennie odpowiednią pożywkę. Oznaczenia wykonano przy użyciu zestawu: Cell proliferation ELISA, BrdU (Roche), zgodnie z uprzednio opublikowaną procedurą [8] i zaleceniami producenta.

Oznaczenie fioletem krystalicznym

Komórki wysiewano na 96 dołkową szalkę w ilości 5×10^3 /dołek. Po 24 godzinach od wysiania, pożywkę standardową wymieniano na pożywkę z odpowiednimi stężeniami CLA i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 - 120 godzin, wymieniając codziennie pożywkę z izomerami CLA. Po tym czasie usuwano pożywkę, komórki utrwalano metanolem i następnie barwiono 0,5 % roztworem fioletem krystalicznym. Nadmiar fioletem odpłukiwano 2-krotnie wodą destylowaną, komórki odbarwiano (0,069 M kwas octowy, 0,037 M cytrynian

sodu w 1:1 H₂O/metanol) i mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm.

Analiza statystyczna wyników

Wszystkie oznaczenia były wykonane w czterech powtórzeniach, w trzech niezależnych doświadczeniach. Wartości na wykresach przedstawiono jako średnie \pm SD. Istotność statystyczną sprawdzano testem *U Manna-Whitneya*. Różnice uznawano za znamienne statystycznie dla $P < 0,01$.

WYNIKI

Ocena cytotoksyczności izomerów CLA na komórki linii MCF-7 i T47D

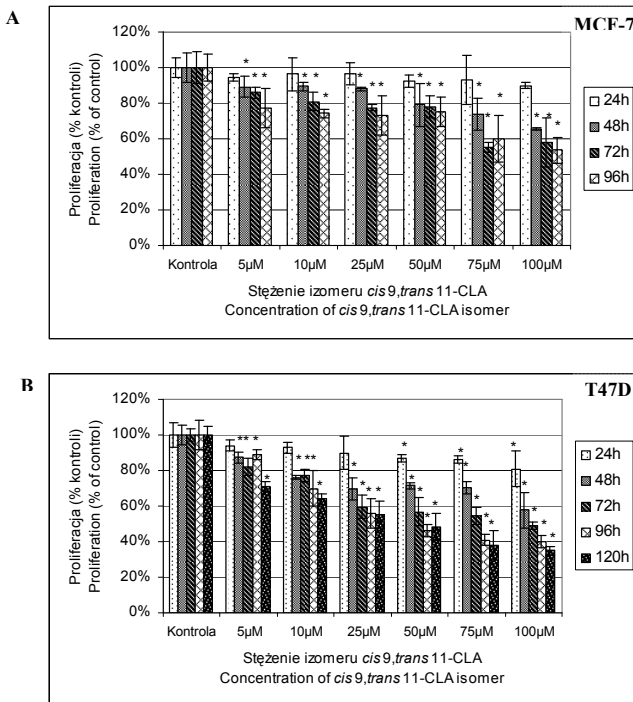
Badanie cytotoksyczności izomerów CLA na komórki linii MCF-7 i T47D, przeprowadzono przez oznaczenie aktywności enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w mediach komórkowych. Dezintegracja błony komórkowej wywołana procesem nekrozy w odpowiedzi na czynnik toksyczny powoduje uwalanie tego enzymu do medium komórkowego. Żaden z badanych izomerów CLA w zakresie stężeń 5 – 100 μ M, w czasie 24 - 120 godzin, nie wywoływał statystycznie istotnego wzrostu aktywności LDH, a obliczone wartości cytotoksyczności nie przekraczały 10% (Ryc. 1). Wartość poniżej 10% oznacza, iż działający czynnik nie wywiera efektu cytotoksyczności na badane komórki. Dla stężeń CLA: 150 μ M i 200 μ M, w czasie 24 - 120 godzin wartości cytotoksyczności przekraczały 10% (dane nie przedstawiane), dlatego w badaniach zastosowano izomery CLA w zakresie 5 – 100 μ M.

Proliferacja komórek MCF-7 i T47D

Wpływ izomeru cis9, trans11-CLA na proliferację komórek linii MCF-7 i T47D.

Zdolność komórek linii MCF-7 i T47D do proliferacji w obecności izomeru *cis9,trans11-CLA* sprawdzano poprzez barwienie komórek fioletem krystalicznym po 24 - 120 godzinnej inkubacji komórek w pożywce zawierającej różne jego stężenia. Zarówno w hodowli MCF-7 jak i T47D obserwowano zmniejszenie proliferacji komórek narastające ze wzrostem stężenia izomeru i czasu inkubacji komórek z izomerem *cis9,trans11-CLA* (Ryc. 2). Bardziej wrażliwe na działanie izomeru wydają się komórki linii T47D (Ryc. 2B), dla których obniżenie proliferacji do 45 % względem kontroli obserwowano już przy niższych stężeniach izomeru *cis9,trans11-CLA* (10 – 25 μ M). Zwiększenie stężenia izomeru i czasu inkubacji z komórkami powodowało dalsze obniżenie proliferacji do ~60 % (75 μ M, 96 h) (Ryc. 2B). W przypadku komórek linii MCF-7 obniżenie proliferacji na poziomie ~45 %, obserwowane było dopiero przy stężeniu 75 - 100 μ M (Ryc. 2A). Izomer

cis9,trans11-CLA w zakresie wszystkich badanych stężeń hamował proliferację komórek obu linii w sposób istotny statystycznie (Ryc. 2 i Ryc. 4).

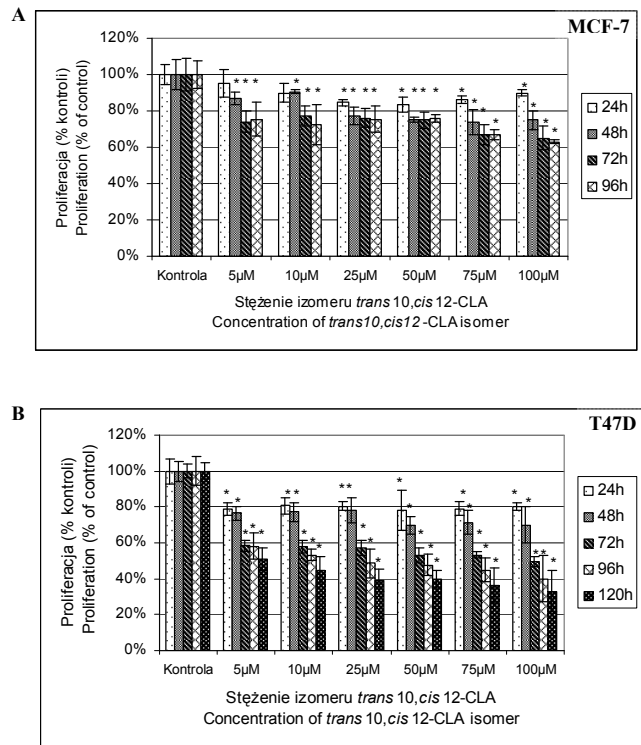


Ryc. 2 Wpływ *cis9,trans11*-CLA na proliferację komórek A. MCF-7 i B. T47D. Oznaczenia wykonano barwiąc komórki fioletem krystalicznym. Słupki przedstawiają średnie \pm SD z czterech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. * $p < 0,01$ vs kontrola w teście *U Manna-Whitneya* Effect of *cis9,trans11*-CLA on proliferation the cells A. MCF-7 i B. T47D. The proliferation was determined with the use crystal violet test. Bars represent means \pm SD from four separate experiments conducted in triplicate. * $p < 0,01$ vs control in the *U Manna-Whitneya* test

Wpływ izomeru trans10, cis12-CLA na proliferację komórek linii MCF-7 i T47D.

W komórkach traktowanych izomerem *trans10, cis12*-CLA, w teście barwienia komórek fioletem krystalicznym obserwowano spadek proliferacji, istotny statystycznie w obu liniach komórkowych (Ryc. 3 i Ryc. 4). Tendencja spadkowa była zależna od dawki stosowanego izomeru, czasu inkubacji i rodzaju komórek. W przypadku komórek linii MCF-7 obserwowano obniżenie proliferacji do 37 % względem kontroli (Ryc. 3A), natomiast zmniejszenie proliferacji komórek T47D było dwukrotnie większe 65 %, (Ryc. 3B). Komórki linii T47D (Ryc. 3B), były bardziej wrażliwe na działanie izomeru *trans10, cis12*-CLA i odpowiadały zmianą proliferacji (40 – 50 % zmniejszenie proliferacji) już przy 5 μ M stężeniu izomeru. Zwiększenie stężenia izomeru *trans10, cis12*-CLA, a przede wszystkim czasu inkubacji komórek z izomerem powodowało dalsze obniżenie

proliferaacji do 65% (75-100 μ M, 120 h). Komórki linii MCF-7 słabiej reagowały na traktowanie izomerem *trans10, cis12*-CLA. Stężenia izomeru poniżej 50 μ M powodowały nieznaczne zmniejszenie proliferacji \sim 25 %, natomiast zwiększenie stężenia izomeru i czasu działania zwiększały ten efekt do 37% (Ryc. 3A).

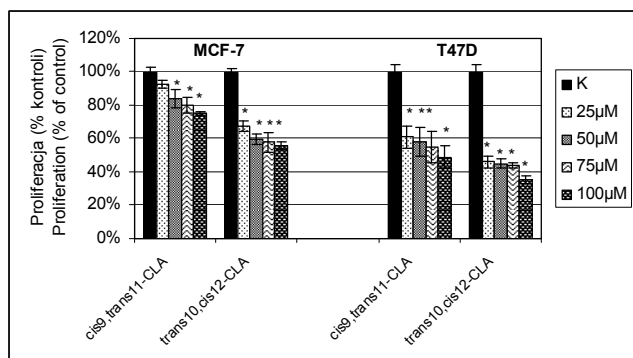


Ryc. 3 Wpływ *trans10, cis12*-CLA na proliferację komórek A. MCF-7 i B. T47D. Oznaczenia wykonano barwiąc komórki fioletem krystalicznym. Słupki przedstawiają średnie \pm SD z czterech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. * $p < 0,01$ vs kontrola w teście *U Manna-Whitneya* Effect of *trans10, cis12*-CLA on proliferation the cells A. MCF-7 i B. T47D. The proliferation was determined with the use crystal violet test. Bars represent means \pm SD from four separate experiments conducted in triplicate. * $p < 0,01$ vs control in the *U Manna-Whitneya* test

Porównanie wpływu obu izomerów na proliferację komórek linii MCF-7 i T47D.

Wpływ izomerów CLA: *cis9,trans11* i *trans10, cis12* na proliferację obu typów komórek po 48 godzinnej inkubacji, porównano poprzez oznaczenie ilości wbudowanej 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) do DNA proliferujących komórek. Obydwa izomery CLA hamowały proliferację komórek (Ryc. 4), jednakże izomer *trans10, cis12*-CLA wyraźniej hamował proliferację komórek obydwu linii. Obserwowane zmniejszenie proliferacji pod wpływem izomeru *trans10, cis12*-CLA wynosiło \sim 40 % dla komórek linii MCF-7 i \sim 60 % dla linii T47D. Komórki linii T47D podobnie jak w teście

barwienia komórek fioletem krystalicznym, były bardziej wrażliwe na działanie obydwu izomerów CLA.



Ryc. 4 Wpływ *cis9,trans11*-CLA i *trans10,cis12*-CLA na proliferację komórek MCF-7 i T47D (48 godz. inkubacji). Oznaczenie wykonano testem BrdU. Słupki przedstawiają średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. * $p < 0,01$ vs kontrola w teście *U Manna-Whitneya*.

Effect of *cis9,trans11*-CLA and *trans10,cis12*-CLA on proliferation of MCF-7 and T47D cells (48-hour incubation). The proliferation was determined with the use BrdU test. Bars represent means \pm SD from three separate experiments conducted in triplicate * $p < 0,01$ vs control in the *U Manna-Whitneya* test.

DYSKUSJA

Sprężone dieny kwasu linolowego wpływają na szerokie spektrum procesów zachodzących w organizmie człowieka m.in. proliferację, wzrost i różnicowanie komórek. Jako istotny składnik diety CLA mają wpływ na obniżenie proliferacji komórek nowotworowych, przez co wydają się być obiecującym czynnikiem zmniejszającym ryzyko wystąpienia nowotworu. Dotychczasowe badania *in vitro* a także *in vivo* wskazują na hamujący wpływ CLA na rozwój nowotworów piersi [3, 8], jelita grubego [7, 23], prostaty [16], w mniejszym stopniu na proliferację komórek nowotworowych skóry [4]. W powyższych pracach, obserwowana była tendencja spadkowa proliferacji komórek, a efektywność działania CLA była zależna od rodzaju izomeru, jego stężenia i czasu działania, jak również od zastosowanego modelu badawczego. Przeprowadzone przez nas badania również wskazują na hamujący wpływ izomerów CLA: *cis9,trans11* oraz *trans10,cis12* na proliferację komórek dwu linii nowotworowych piersi MCF-7 i T47D, przy czym efekt był różny dla każdej z linii i mógł wynikać z ich hormonozależności. Komórki linii T47D (obecny receptor estrogenowy, androgenowy, progesteronowy) charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie badanych izomerów (Ryc. 2, Ryc. 3, Ryc. 4) w porównaniu do komórek linii MCF-7 (obecny receptor

estrogenowy). Znaczące obniżenie proliferacji komórek T47D obserwowano już przy stężeniu 5 μ M i 10 μ M, odpowiednio izomeru *cis9,trans11* i *trans10,cis12*, a wzrost stężenia izomerów, powodował dalsze obniżenie proliferacji komórek (Ryc. 2B, Ryc. 3B). Spośród badanych izomerów, *trans10,cis12*-CLA bardziej efektywnie hamował proliferację komórek MCF-7 i T47D (Ryc. 4), co może wynikać z różnych mechanizmów hamowania procesu proliferacji badanych komórek nowotworowych przez zastosowane izomery CLA. Ochoa i wsp. [16] wykazali, że w komórkach nowotworu prostaty PC-3, izomer *trans10,cis12*-CLA zmniejszała ekspresję genu Bcl-2 i zwiększała ekspresję genu p21 [16], natomiast izomer *cis9,trans11*-CLA powodował spadek ekspresji cyklooksygenazy COX-2 [16]. Obserwowany przez nas spadek proliferacji (Ryc. 2A, Ryc. 3A) pod wpływem *cis9,trans11*-CLA był znaczący tylko dla wyższych stężeń izomeru (75 - 100 μ M) i dłuższych czasów inkubacji z komórkami (72 - 96 h). Badania przeprowadzone na komórkach nowotworu jelita grubego Caco-2 [7] wykazały, że hamowanie proliferacji pod wpływem izomerów CLA w większym stopniu zależy od czasu ich oddziaływania na komórki niż od ich stężenia. Przeprowadzone przez nas badania potwierdzają tę zależność dla komórek nowotworu piersi, szczególnie linii T47D (Ryc. 2, Ryc. 3).

Mechanizm przeciwnowotworowego oddziaływania CLA jest przedmiotem licznych badań. Przypuszcza się, że CLA mogą hamować proliferację komórek nowotworowych poprzez ingerencję w fazę G1 cyklu komórkowego wpływając na poziom białek decydujących o jego progresji. W komórkach linii MCF-7 wykazano hamujący efekt CLA na cyklinę D1 i cyklinę E przy jednoczesnej akumulacji białka p53, p27 i p21WAF1/Cip1 [9, 16]. Dyskutowany jest również mechanizm, którego podłożem są przeciwzapalne właściwości CLA, związane z ich bezpośrednią zdolnością do substytucji arachidonianu (AA) w fosfolipidach błon komórek nowotworowych. W konsekwencji może dojść do obniżenia syntezy prozapalnych pochodnych cyklooksygenaz i lipooksygenaz i zahamowania m.in. innymi procesami angiogenezy tkanki nowotworowej. Omawiany mechanizm przeciwnowotworowego oddziaływania CLA może mieć również charakter pośredni. CLA jako ligandy czynników transkrypcyjnych, głównie NF- κ B i PPAR, hamują ekspresję prozapalnych cytokin IL-1, IL-6, TNF- α oraz COX-2 w komórkach nowotworowych [24]. Zmniejszenie aktywacji NF- κ B pod wpływem CLA wykazano w badaniach prowadzonych na komórkach dendrytycznych [13], mięśni gładkich [21], nowotworowych [22], na makrofagach [24] i osteoklastach [20] a także *in vivo* u myszy z eksperymentalnie wywołanym zapaleniem jelita [1]. Zjawisko aktywacji ekspresji mRNA PPAR α wykazano w komórkach nowotworowych [14] oraz w aortach mysz karmionych

paszą z dodatkiem CLA [26]. Badania prowadzone na linii komórek nowotworu piersi MCF-7 wskazują na indukcję transkrypcji genu PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) pod wpływem ligandów PPAR, co wpływa na obniżenie proliferacji i uruchomienie procesu apoptozy [25].

Kolejnym etapem prowadzonych badań będzie wyjaśnienie mechanizmu zaangażowanego w obserwowany efekt hamowania proliferacji w komórkach nowotworu piersi pod wpływem CLA.

WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Izomery: *cis*9,*trans*11-CLA i *trans*10,*cis*12-CLA w stężeniu 5 -100 μM nie wykazywały cytotoksycznego wpływu na komórki linii MCF-7 i T47D.
2. Izomery CLA: *cis*9,*trans*11 i *trans*10,*cis*12 hamowały proliferację komórek nowotworu piersi (MCF-7, T47-D) a obserwowany efekt był zależny od czasu inkubacji z komórkami i stężenia izomerów w pożywce.
3. Izomer *trans*10,*cis*12-CLA bardziej efektywnie hamował proliferację komórek MCF-7 i T47D.
4. Komórki linii T47D charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie badanych izomerów, w porównaniu do komórek linii MCF-7.

PIŚMIENNICTWO

1. Bassaganya-Riera J., Reynolds K., Martino-Catt S., Cui Y., Hennighausen L., Gonzalez F. et al.: Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004, 127, 777-791.
2. Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L., Pariza M.W.: Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogenes. *J. Food Compos. Anal.* 1992, 5, 185-197.
3. Chujo H., Yamasaki M., Nou S., Koyanagi N., Tachibana H., Yamada K.: Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2003, 202, 81-7.
4. De La Torre, Debiton E., Juanéda P., Durand D., Chardigny JM, Barthomeuf C, Bauchart D, Gruffat D.: Beef CLA isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. *Br J Nutr.* 2006, 95, 346-52.
5. Dhiman T.R., Nam S.H., Ure A.L.: Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 463-482.
6. Dulińska J., Gil D., Zagajewski J., Hartwich J., Bodzioch M., Dembinska-Kiec A., Langmann T., Schmitz G., Laidler P.: Different effect of beta carotene on proliferation of prostate cancer cells. *BBA Section: BBA – Molecular Basis of Disease* 2005, 1740, 189-201.
7. Huang G, Zhong X, Cao Y, Chen Y.: Antiproliferative effects of CLA on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007, 16, 432-436.
8. Hubbard NE, Lim D, Erickson KL.: CLA alters Matrix Metalloproteinases of Metastatic Mouse Mammary Tumor Cells. *J. Nutr.* 2007, 137, 1423-1429.
9. Kemp M.Q., Jeffy B.D., Romagnolo D.F.: Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. *J. Nutr.* 2006, 133, 3670-7.
10. Knekt P., Jaevinen R., Seppanen R. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br. J. Canc.* 1996, 73, 687-691.
11. Laidler P., Dulińska J., Mrozicki S.: Does the inhibition of c-myc expression mediate the anti-tumor activity of PPAR'S ligands in prostate cancer cell lines. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 462, 1-12.
12. Lampen A., Leifheit M., Voss J., Nau H.: Molecular and cellular effects of cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005, 1735, 30-40.
13. Loscher C.E., Draper E., Leavy O., Kelleher D., Mills K.H., Roche H.M.: Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J. Immunol.* 2005, 175, 4990-4998.
14. Moya-Camarena S.Y., Vanden Heuvel J.P., Blanchard S.G., Leesnitzer L.A., Belury M.A.: Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR alpha. *J. Lipid Res.* 1999, 40, 1426-1433.
15. Nagao K., Yanagita T.: Conjugated fatty acids in food and their health benefits. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100, 152-157.
16. Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD, Wahle KW: Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis.* 2004, 25, 1185-1191.
17. Pariza M.W., Ashoor S.H., Chu F.S. Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* 1979, 7, 63-69.
18. Perfield JW 2nd, Delmonte P, Lock AL, Yurawecz MP, Bauman DE: Trans-10, trans-12 conjugated linoleic acid does not affect milk fat yield but reduces delta 9-desaturase index in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006, 89, 2559-2566.
19. Pisulewski P.M., Achremowicz K., Kostogryś R.B., Franczyk M.: Biochemiczne mechanizmy prozdrowotnego oddziaływania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na stan zdrowia człowieka. *Post. Nauk Roln.* 2005, 6, 109-111.
20. Rahman M.M., Bhattacharya A., Fernandes G.: Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling. *J. Lipid Res.* 2006, 47, 1739-1748.

21. Ringseis R., Muller A., Herter C., Gahler S., Steinhart H., Eder K.: CLA isomers inhibit TNF alpha – induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR gamma ligand-like action. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 760, 290-300.
22. Shah S.A., Mahmud N., Mftah M., Roche H.M., Kelleher D.: Chronic but not acute conjugated linoleic acid treatment inhibits deoxycholic acid-induced protein kinase C and nuclear factor – kappa B activation in human colorectal cancer cells. *Eur. J. Cancer Prev.* 2006, 15, 125-133.
23. Soel SM, Choi OS, Bang MH, Yoon Park JH, Kim WK.: Influence of CLA isomers on the metastasis of colon cancer in vitro and in vivo. *J. Nutr. Biochem.* 2007, 18, 650-657.
24. Stachowska E.: Wpływ sprzężonych dienów kwasu linolowego na syntezę pochodnych kwasu arachidonowego i linolowego w monocytach /makrofagach. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.* 2007, supl. 118.
25. Teresi R. E., Shaiu C.-W., Chen C.-S., Chatterjee V. K., Waite K. A., Eng C.: Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPAR γ by Lovastatin Rosiglitazone. *Int. J. Cancer Suppl.* 2006, 118, 2390–2398.
26. Toomey S., Roche H., Fitzgerald D., Belton O.: Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE $^{-/-}$ mouse by conjugated linoleic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31, 1075-1079.
27. Wronkowski Z., Chmielarczyk W., Zwierko M.: Rak piersi: Zagrożenie populacji polskiej. *Służba Zdrowia* 2000, 24-26, 2917-2919.

Otrzymano: 04.09.2008

Zaakceptowano do druku: 23.06.2009

