

ANETA KORONOWICZ¹, JOANNA DULIŃSKA-LITEWKA²,
PAWEŁ PISULEWSKI¹, PIOTR LAIDLER²

WPLYW LIPIDÓW ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO WZBOGACONEGO W IZOMERY SPRZĘŻONEGO KWASU LINOLOWEGO NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK MCF-7

Streszczenie

Sprzężony kwas linolowy (ang. conjugated linoleic acid - CLA) jest terminem zbiorczym obejmującym grupę pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego, w których występują sprzężone wiązania podwójne. Wyniki licznych prac jednoznacznie wskazują na przeciwnowotworowe właściwości izomerów CLA, m.in. ich zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych różnych linii w modelu *in vitro*. Prowadzone obecnie badania kierują się w stronę modyfikowania zawartości CLA w wielu produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego takich jak: mięso, jaja, masło. Ma to duże znaczenie praktyczne, ponieważ żywność funkcjonalna może zapobiegać i wspomagać leczenie wielu chorób cywilizacyjnych w tym także chorób nowotworowych.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego w izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12* na proliferację komórek nowotworowych piersi linii MCF-7 (ATCC Collection). Żółtko jaja kurzego zostało wzbogacone w izomery CLA w sposób naturalny na drodze karmienia kur niosek mieszaniną izomerów CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12* (4).

Komórki inkubowano z hydrolizatem lipidów żółtka jaja kurzego w zakresie stężeń 0,12; 0,36; 0,73 mg/ml i czasie 24 - 72 godziny, po czym mierzono proliferację komórek. W podanym zakresie stężeń nie obserwowano cytotoksycznego wpływu hydrolizatu na komórki w teście LDH (ang. *Lactic Dehydrogenase*; Roche).

Z uzyskanych wyników można wnioskować, że lipidy żółtka jaja z wbudowanymi izomerami CLA bardziej efektywnie hamują proliferację komórek MCF-7 niż lipidy żółtka jaja bez udziału CLA.

Słowa kluczowe: Sprzężony kwas linolowy (CLA), *cis9,trans11*-CLA, *trans10,cis12*-CLA, MCF-7, żywność funkcjonalna, rak piersi, proliferacja.

¹ Mgr inż. A. Koronowicz, prof. dr hab. P. Pisulewski, Katedra Żywnienia Człowieka, Uniwersytet Rolniczy, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

² Mgr inż. J. Dulińska-Litewka, mgr inż. P. Laidler, Katedra Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medium, ul. Gołębia 24, 31-007 Kraków

Wprowadzenie

Nowotwory zajmują drugie miejsce w liczebności chorób cywilizacyjnych, a wśród nich rak piersi stanowi główną przyczynę zgonów kobiet w Polsce i na świecie [10, 16]. Spośród wielu czynników zmniejszających ryzyko wystąpienia nowotworu, szczególną rolę przypisuje się izomerom sprzężonego kwasu linolowego (CLA), które charakteryzuje prozdrowotne oddziaływanie na organizm człowieka [13]. W składnikach diety obecne są głównie dwa izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12* [1], przy czym *cis9,trans11* przeważa ilościowo i stanowi dominującą część ogólnej puli CLA [3, 12]. Pierwsze informacje na temat potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych CLA pojawiły się pod koniec lat 70. XX w. [11], a następnie potwierdzone zostały w szeregu badań *in vitro* [2, 8] i *in vivo* [9, 15].

Celem przeprowadzonych przez nas badań, była ocena wpływu lipidów żółtka jaja kurzego, naturalnie wzbogaconego w izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12*, na proliferację komórek nowotworowych piersi MCF-7. Wybór jaja kurzego, jako nośnika izomerów CLA został podyktowany wysoką podatnością lipidów żółtka jaja na modyfikację żywieniową oraz powszechną dostępnością tego produktu spożywczego na rynku. Ponadto jaja cechują się wielofunkcyjnymi właściwościami jak również wysoką wartością żywieniową w świetle, których negatywna rola cholesterolu powinna być ignorowana. Badania ostatnich lat dowodzą jednoznacznie, że jaja kurze z uwagi na obecność dużej ilości bioaktywnych składników stają się najlepszym surowcem do zastosowań nutraceutycznych i biomedycznych [5].

Material i metody badań

Komórki nowotworowe linii MCF-7 (ATTC Collection, USA) hodowano w medium MEM (Sigma-Aldrich), w obecności 10% FBS (Gibco), antybiotyku (Sigma-Aldrich) [100 µg/ml], pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich) [110 mg/L] i insuliny (Sigma-Aldrich) [0,01mg/ml]. Komórki hodowano na szalkach 10Ø (BD Biosciences) w warunkach hodowli komórkowej (37°C, 5% CO₂). Do eksperymentu używano komórki maksymalnie po 6 - 7 pasażach.

Hydrolizat lipidów żółtka jaja kurzego przygotowano poprzez zmydlanie tłuszczu w KOH. Wolne kwasy tłuszczowe wyekstrahowano, rozpuszczono w etanolu i przechowywano w temperaturze -20 °C. Profil kwasów tłuszczowych ustalono przy pomocy GC-MS (Shimadzu QP 5050A) (tab. 1).

Wpływ hydrolizatu żółtka jaja kurzego na żywotność komórek oznaczano w zakresie badanych stężeń po 24, 48 i 72 godzinach, przy użyciu zestawu do badania cytotoksyczności (Cytotoxicity Detection Kit LDH - Roche) zgodnie z zaleceniami producenta.

Proliferację komórek nietraktowanych (kontrola – komórki w pożywce MEM + 10 % FBS) i komórek traktowanych hydrolizatem lipidów żółtka jaja kurzego w czasie 24, 48, 72 godzin badano poprzez barwienie komórek fioletem krystalicznym.

Tabela 1

Profil kwasów tłuszczowych oznaczony GC-MS (SHIMADZU QP 5050A)
Lipid acid profile determined by GC-MS (SHIMADZU QP 5050A)

Żółtko jaja kurzego wzbogacone w izomery CLA Egg yolk enriched with CLA isomers		Żółtko jaja kurzego nie wzbogacone w izomery CLA Egg yolk unenriched with CLA isomers	
Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Udział %	Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Udział %
Tetradekanowy	0,65	Tetradekanowy	0,42
Pentadekanowy	0,09	Pentadekanowy	0,06
Heksadekanowy	27,19	Heksadekanowy	22,88
(Z)-9-heksadecenowy	1,05	(Z)-9-heksadecenowy	2,24
heptadekanowy	0,37	heptadekanowy	0,26
oktadekanowy	21,35	oktadekanowy	10,71
(Z)-9-oktadekadenowy	26,0	(Z)-9-oktadekadenowy	41,58
(Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	18,38	(Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	20,04
(Z,Z,Z)-9,12,15 oktadekatrienowy	1,13	(Z,Z,Z)-9,12,15 oktadekatrienowy	0,8
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11-CLA	2,3	<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11-CLA	0
<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12-CLA	0,9	<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12-CLA	0
eikozenowy	0,29	eikozenowy	0,07
eikozadienowy	0,17	eikozadienowy	0,25
arachidonowy	0,13	arachidonowy	0,3

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 badanych czynników i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 - 72 godzin. Po tym czasie usuwano pożywkę, komórki utrwalano metanolem i następnie barwiono 0,5 % roztworem fioleto krystalicznego. Nadmiar fioleto odpłukiwano 2-krotnie wodą destylowaną, komórki odbarwiano (0,069 M kwas octowy, 0,037M cytrynian sodu w 1:1 H₂O/metanol) i mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm.

Wszystkie oznaczenia były wykonane w trzech powtórzeniach, w trzech niezależnych doświadczeniach. Wartości na wykresach przedstawiono jako średnie \pm SD. Istot-

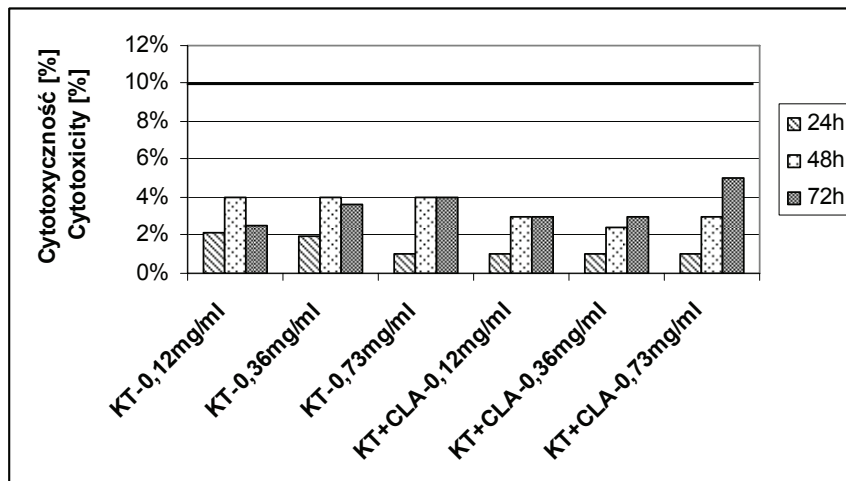
ność statystyczną sprawdzano testem U Manna-Whitneya. Różnice uznawano za znamienne statystycznie dla $P < 0,01$.

Wyniki i dyskusja

Badanie cytotoksyczności hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego na komórki linii MCF-7, przeprowadzono przez oznaczenie aktywności enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium komórkowym. Dezintegracja błony komórkowej wywołana procesem nekrozy w odpowiedzi na czynnik toksyczny, powoduje uwalnianie tego enzymu do medium komórkowego. Żaden z badanych czynników: kwas tłuszczowy (KT) i KT+CLA w zakresie stężeń 0,12 – 0,73 mg/ml i czasie 24 - 72 godziny, 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 cytotoksycznego efektu na badane komórki.

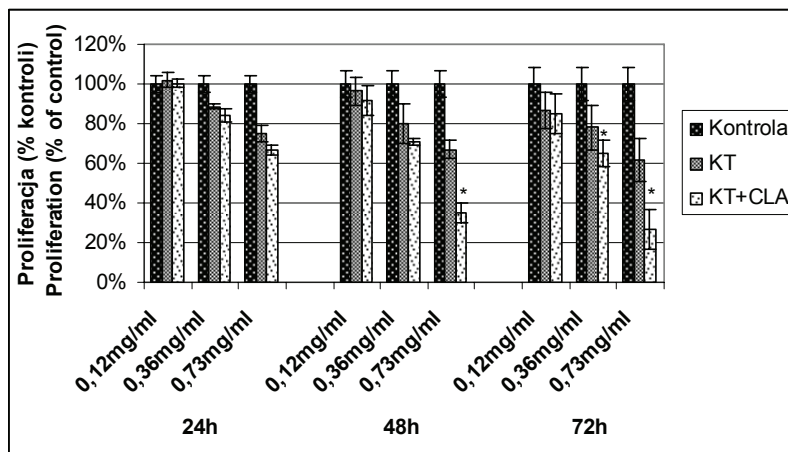
Zdolność komórek linii MCF-7 do proliferacji w obecności hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego sprawdzano poprzez barwienie komórek fioletem krystalicznym po 24 - 72 godzinnej inkubacji komórek w pożywce zawierającej różne jego stężenia. Proliferacja komórek spada liniowo ze wzrostem stężenia hydrolizatu i czasu jego działania (Ryc. 2). Na uwagę zasługuje obserwacja znaczącego spadku proliferacji komórek pod wpływem hydrolizatu żółtka jaja modyfikowanego w izomery CLA. Zastosowanie hydrolizatu o stężeniu 0,73 mg/ml powodowało zmniejszenie proliferacji komórek ~70 % w przypadku dłuższych czasów inkubacji. Różnice w spadku proliferacji są istotne statystycznie nie tylko w stosunku do komórek nietraktowanych (kontrola), ale również w stosunku do hydrolizatu żółtka jaja nie wzbogaconego w izomery CLA. W porównaniu do tych ostatnich obserwowana różnica w spadku proliferacji wynosi ~30 %, szczególnie po dłuższym czasie inkubacji z komórkami MCF-7.

W ostatnich latach obserwuje się bardzo intensywne poszukiwania preparatów profilaktycznych o cechach nutraceutyków, czy suplementów diety celem zapobiegania czy zmniejszenia skutków chorób współczesnej cywilizacji. Zaliczamy do nich choroby sercowo-naczyniowe, choroby nowotworowe i otępienne mózgu oraz choroby wieku podeszłego [6, 7, 10]. Trend ten związany jest z podnoszeniem jakości życia oraz „walką” z chorobą poprzez jej zapobieganie. Spośród wielu naturalnych produktów, najdoskonalszym pod względem bioróżnorodności, wartości odżywczej i kosztów produkcji, jest bez wątpienia kurze jajo. Szczególnie interesującym wydaje się możliwość, naturalnego, poprzez odpowiednie żywienie kur niosek, wzbogacania żółtka jaja w prozdrowotne kwasy tłuszczowe w tym CLA. Modyfikacje mieszanek paszowych dla niosek doprowadziły do powstania w ten sposób jaj wzbogaconych w kwasy tłuszczowe omega-3 [14].



Rys. 1. Cytotoksyczny wpływ hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego (KT+CLA) w izomery CLA i nie wzbogaconego (KT) w izomery CLA na komórki linii MCF-7. Oznaczenie wykonano testem Cytotoxicity Detection (LDH) Kit i przedstawiono jako średnią z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach.

Fig. 1. Cytotoxic effect of lipids hydrolysate of egg yolk enriched with CLA isomers on the MCF-7 cells. The results were determined with the use Cytotoxicity Detection (LDH) Kit and given as means from three separate experiments conducted in three trials.



Rys. 2. Wpływ hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego (KT+CLA) w izomery CLA i nie wzbogaconego (KT) w izomery CLA na proliferację komórek MCF-7. Oznaczenia wykonano barwiąc komórki fioletem krystalicznym. Słupki przedstawiają średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. * $p < 0,01$ vs KT w teście U Manna-Whitneya.

Fig. 2. Effect of lipids hydrolysate of egg yolk enriched with CLA isomers (KT + CLA) and unenriched with CLA isomers (KT) on proliferation of the MCF-7 cells. The proliferation was determined with the use crystal violet test. Bars represent means \pm SD from three separate experiments conducted in triplicate.

* $p < 0,01$ vs KT in the U Manna-Whitneya test.

Przeprowadzone przez nas badania wskazują na możliwość wzbogacania żółtka jaja w izomery CLA z zachowaniem typowych jego właściwości, jako produktu spożywczego [4].

Badania nad potencjalnym wpływem lipidów żółtka z wbudowanymi CLA na proliferację komórek MCF-7, zaowocowały korzystnym spadkiem proliferacji komórek raka piersi bez efektu cytotoksyczności. Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność zastosowania lipidów żółtka z wbudowanymi CLA i przemawiają za dalszymi badaniami nad możliwością stosowania jaja kurzego, jako nutraceutyku w profilaktyce chorób nowotworowych.

Wniosek

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wzbogacenie lipidów żółtka jaja kurzego w izomery CLA efektuje większym wpływem na obniżenie proliferacji komórek nowotworowych piersi, a obraz ten nie jest wynikiem cytotoksyczności badanego czynnika.

Literatura

- [1] Chin S.F., Liu W., Storkson J.M. i wsp.: Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogenes. *J. Food Compost. Anal.* 1992; 5,185-197.
- [2] Chujo H., Yamasaki M., Nou S. i wsp.: Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2003, 202, 81-7.
- [3] 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.
- [4] Franczyk-Żarów M., Kostogryś R.B., Szymczyk B. i wsp.: Functional effects of eggs, naturally enriched with conjugated linoleic acid (CLA), on the blood lipid profile, development of atherosclerosis and composition of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double-knockout mice (apoE/LDLR $-/-$). *Brit J Nutr* 2008, 99, 49-58.
- [5] Gębczyński P., Jaworska G.: Żywność wzbogacona i nutraceutyki. PTTŻ, Kraków 2009, 76-89.
- [6] Gil G.P., Ramirez Diaz S.P., Ribera Casado J.M.: DEMENU group. Dementia and Nutrition. Intervention study in institutionalized patients with Alzheimer disease. *Nutr Health Aging.* 2007, 5, 304-308.
- [7] Green K.N., Martinez-Coria H., Khashwji H. i wsp.: Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J. Neurosci.* 2007, 16, 4385-4395.
- [8] Huang G., Zhong X., Cao Y. i wsp.: Antiproliferative effects of CLA on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007, 16, 432-436.
- [9] Hubbard N.E., Lim D., Erickson K.L.: CLA alters Matrix Metalloproteinases of Metastatic Mouse Mammary Tumor Cells. *J.Nutr.* 2007, 137, 1423-1429.
- [10] Ołędzka R.: Nutraceutyki, żywność funkcjonalna-rola i bezpieczeństwo stosowania. *Bromat. Chem. Toxykol.* 2007, 1, 1-8.
- [11] 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.
- [12] Perfield J.W., Delmonte P., Lock A.L. i wsp.: 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.

- [13] Pisulewski P.M., Achremowicz K., Kostogrys R.B. i wsp.: Biochemiczne mechanizmy prozdrowotnego oddziaływania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na stan zdrowia człowieka. *Post. Nauk Roln.* 2005, 6, 109-111.
- [14] Sim J.S., Sunwoo H.H.: Designer eggs: nutritional and functional significance. In *Eggs and Health Promotion*; Watson, R.R., Ed.: Iowa State Press: Ames, IA, pp 19-35.
- [15] Soel S.M., Choi O.S., Bang M.H. i wsp.: Influence of CLA isomers on the metastasis of colon cancer *in vitro* and *in vivo*. *J Nutr Biochem.* 2007, 18, 650-657.
- [16] Wronkowski Z., Chmielarczyk W., Zwierko M.: Rak piersi: Zagrożenie populacji polskiej. *Służba Zdrowia.* 2000, 26, 2917-2919

EFFECT OF LIPIDS ORIGINATING FROM EGG YOLK ENRICHED WITH CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS ON PROLIFERATION OF MAMMARY CANCER CELLS

Summary

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term describing a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with two conjugated double bonds. A considerable number of papers suggest anticarcinogenic properties of CLA, including their ability to suppress the growth of different cancer cell lines *in vitro*. The present research tendencies are focused on modification of CLA contents in numerous animal-derived food products, such as meat, eggs and butter. This is of a considerable practical significance, since functional food may be a preventive factor and aid treatment of many civilization diseases, including malignancies.

The objective of the study was the investigation of the effect of lipids originating from egg yolk enriched with CLA isomers: *cis9,trans11* and *trans10,cis12* on proliferation of MCF-7 (ATCC Collection) mammary cancer cells. Egg yolk was enriched with CLA isomers in a natural manner, through feeding laying hens with a mixture of CLA isomers: *cis9,trans11* and *trans10,cis12* (4).

The cells were incubated with lipids hydrolysate of egg yolk enriched with CLA isomers: *cis9,trans11* or *trans10,cis12*, within the range of 0.12, 0.36 and 0.73 mg/ml for 24-72 h. There were no toxic effects of the hydrolysate on the cells as indicated by the Cytotoxicity Detection Kit (Roche).

The results indicate that lipids of egg yolk with incorporated CLA isomers were more effective in inhibiting MCF-7 cell proliferation as compared to lipids originating from egg yolk without CLA enrichment.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), *cis9,trans11*-CLA, *trans10,cis12*-CLA, MCF-7, functional food, breast cancer, cell proliferation. ☒