

## **ZŁOTY MEDAL NA WYSTAWIE „EUREKA 2002” W BRUKSELI DLA PREPARATU Z MLEKA OWCZEGO**

Prof. dr hab. B. Patkowska-Sokoła, dr R. Bodkowski

Na 51 Światowej Wystawie Inowacji, Badań i Nowych Technologii, która odbyła się w Brukseli w dniach 12-17.XI.2002 interdyscyplinarny zespół badawczy w osobach: prof. dr hab. Bożena Patkowska-Sokoła, dr inż. Robert Bodkowski (Akademia Rolnicza we Wrocławiu - Instytut Hodowli Zwierząt), dr inż. Wiesława Walisiewicz-Niedbalska, prof. dr hab. Andrzej Lipkowski, dr inż. Jacek Kwiatkowski, mgr inż. Hanna Gwardiak, mgr inż. Krzysztof Różycki (Instytut Chemii Przemysłowej im. I. Mościckiego w Warszawie); dr hab. Adam Opolski, dr. Joanna Wietrzyk (PAN we Wrocławiu - Instytut Immunologii Nowotworów) otrzymał złoty medal z wyróżnieniem za badania nad wykorzystaniem tłuszczu mleka owczego wzbogaconego w sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) w prewencji chorób nowotworowych.

Pomysłodawcą i koordynatorem badań była prof. dr hab. B. Patkowska-Sokoła.

W ostatnich latach przedmiotem szczególnego zainteresowania naukowców z różnych dziedzin nauki są sprzężone dieny kwasu linolowego C<sub>18:2</sub> (ang. CLA - conjugated linoleic acids), w których wiązania podwójne, zarówno w formie cis jak i trans, izolowane są jednym wiązaniem pojedynczym.

Te skoniugowane formy kwasu linolowego wytwarzane są w wyniku reakcji enzymatycznych przez bakterie symbiotyczne *Butyrivibrio fibrisolvens* (występujące w żwaczu przeżuwaczy) produkujące niezbędny dla tej reakcji enzym, umożliwiający ich syntezę w ilościach wykazujących biologiczne działanie. W dalszym etapie przemian dieny te wchłaniane są i wbudowywane w lipidy krwi, tkanek i narządów oraz do tłuszczu mleka i mięsa w sposób analogiczny jak inne kwasy tłuszczowe pochodzące z tłuszczów pasz. W znacznie mniejszym stopniu możliwość produkowania tej formy kwasu linolowego mają zwierzęta monogastryczne.

Termin CLA określa mieszaninę izomerów kwasu linolowego, wśród których najbardziej poznany jest izomer kwasu linolowego o konfiguracji *cis-9 trans-11* stanowiący ponad 90% wszystkich izomerów kwasu linolowego ze sprzężonymi wiązaniami nienasyconymi.

Sprzężone dieny kwasu linolowego posiadają szereg swoistych właściwości m.in.: przeciwdziałają miażdżycy, osteoporozie, zapobiegają otyłości, stymulują układ odpornościowy. Ich metabolity wywierają silne działanie antyoksydacyjne oraz wpływają na biosyntezę eikozanoidów, co jest podstawą ich korzystnego wielokierunkowego działania. Największe jednak nadzieje związane są z ich przeciwnowotworowymi właściwościami.

Wychodząc naprzeciw temu zagadnieniu wyżej wymieniony zespół badawczy przeprowadził badania mające na celu:

- monitoring zawartości sprzężonego dienu kwasu linolowego o konfiguracji *cis-9 trans-11* w mleku pochodzącym od różnych gatunków zwierząt;
- zwiększenie, metodą krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, koncentracji sprzężonego dienu kwasu linolowego c9t11 w tłuszczu wyekstrahowanym z mleka owczego;
- przeprowadzenie metodami *in vitro* oraz *in vivo* antyproliferacyjnych testów na liniach komórkowych ludzkich nowotworów z preparatem z mleka owczego o zwiększonej koncentrację izomeru kwasu linolowego c9t11.

W pierwszym etapie badań oznaczono zawartość sprzężonego dienu kwasu linolowego o konfiguracji *cis-9 trans-11* w mleku pochodzącym od różnych gatunków zwierząt (krowie, owcze, kozie) oraz zbadano wpływ żywienia na kształtowanie się jego poziomu w mleku (badania wykonano na owcach).

Tłuszcz z mleka ekstrahowano metodą Folcha dodatkowo wydzielając go z warstwy metanolowej eterem naftowym. Oznaczenia zawartości kwasów tłuszczowych (w tym izomeru c9t11) wykonano na chromatografii gazowej PU 4410 firmy Philips z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Do rozdzielania kwasów tłuszczowych użyto kolumny kapilarnej typu Rtx-2330 o grubości 20µm, długości 105m i średnicy 0,25mm.

Na podstawie wykonanych analiz chromatograficznych stwierdzono znaczne różnice gatunkowe w poziomie sprzężonego dienu kwasu linolowego c9t11. Najwyższym poziomem tego dienu charakteryzowało się mleko owcze 1,24% kolejno krowie 0,87% a najniższym mleko kozie 0,67%. Ponadto zaobserwowano, że żywienie zielonką pastwiskową oraz dodatkiem nasion roślin oleistych znacznie podnosi (1,5–2 krotnie) poziom tego izomeru w mleku.

W drugim etapie badań w Instytucie Chemii Przemysłowej im. I Mościckiego w Warszawie na bazie tłuszczu mleka owczego, metodą krystalizacji z mocznika i ekstrakcji dwutlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych, uzyskano preparat o zwiększonej koncentracji CLA (głównie izomeru c9t11). Substratem wyjściowym było mleko owcze (od owiec fryzyskich z gospodarstwa ekologicznego „Folwark Polski” w Łaziskach Poręby koło Twardogóry), które w porównaniu z innymi gatunkami mleka charakteryzowało się znacznie wyższą zawartością tłuszczu i sprzężonego dienu kwasu linolowego c9t11.

Ekstrakcję tłuszczu z mleka przeprowadzono zgodnie z metodyką z I etapu. Następnie tłuszcz przeprowadzono w wolne kwasy tłuszczowe w procesie zmydlania alkoholowym roztworem wodorotlenku potasu i wykwaszenia roztworem HCL. 1/3 wolnych kwasów tłuszczowych o 1,4% zawartości izomeru kwasu linolowego c9t11 pozostawiono do dalszych badań (preparat KT) natomiast pozostałą resztę wykorzystywano do otrzymywania, metodą krystalizację z mocznika i ekstrakcję nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, frakcji wzbogaconej w izomer kwasu linolowego c9t11. W czasie krystalizacji z mocznika wykorzystano zdolność kwasów tłuszczowych nasyconych do tworzenia stałych adduktów z mocznikiem. Filtrat uzyskany po oddzieleniu adduktów średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych z mocznikiem, frakcjonowano metodą ekstrakcji dwutlenkiem węgla uzyskując preparat o 11,2% zawartości izomeru c9t11 (KT/M-CO<sub>2</sub>).

Oznaczenia składu kwasów tłuszczowych wykonano metodą GC. Estry metylowe otrzymywano zgodnie z AOCS Ce2-66. Rozdział przeprowadzano na aparacie HP, detektor FID, kolumna CP Sil 88 długości 100m, temperatura kolumny - 170°C, dozownika - 200°C, detektora - 250°C, gaz nośny – hel. Identyfikację jakościową przeprowadzano przez porównanie czasów retencji składników badanych związków z wzorcami. Identyfikację izomerów położeniowych przeprowadzano metodą GC/MS wykorzystując specyficzną fragmentację pochodnych tłuszczowych z 2-amino-2-metylo-1-propanolem (DMOX). Rozdział estrów metylowych kwasów tłuszczowych na frakcje kwasów tłuszczowych trans i cis przeprowadzano metodą chromatografii cienkowsarstwowej TLC-Ag+.

W wyniku procesu krystalizacji z mocznika usuniętych zostało z tłuszczu mleka owczego ok. 84% kwasów nasyconych średniołańcuchowych (C<sub>14</sub>—C<sub>18</sub>) jako ich adduktów z mocznikiem. W ok. 98% usunięty został kwas palmitynowy natomiast w ok. 87% kwas stearynowy. Z kolei ekstrakcja nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, spowodowała prawie całkowite (w ok. 97%) usunięcie ze środowiska kwasów tłuszczowych krótkołańcuchowych. Uzyskany produkt końcowy preparat KT/M-CO<sub>2</sub> obok izomeru C<sub>18:2</sub> 9c,11t (11,2%) zawierał jako składniki główne: kwas oleinowy i jego izomery głównie kwas wakcenyowy, kwas linolowy i jego izomery oraz kwas linolenowy.

Skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka owczego oraz produktów otrzymanych po jego krystalizacji z mocznika i ekstrakcji CO<sub>2</sub> w warunkach nadkrytycznych podany został w tabeli 1.

Tabela 1.

Kwasy tłuszczowe	Skład kwasów tłuszczowych (%)		
	Preparaty		
	KT	KT/M	KT/M-CO <sub>2</sub>
Nasycone	57,5	17,2	4,4
C4,C6,C8	2,3	3,2	0,1
C10	3,5	3,9	0,1
C12	2,7	2,8	0,1
C13,C15	0,3	0,4	0,0
C14	9,6	3,2	1,8
C16	24,5	1,1	0,5
C17	1,1	0,1	0,0
C18	13,5	2,5	1,8
Nienasycone	38,8	80,1	94,3
C18:1	29,4	62,5	66,2
C18:1 t11	2,8	4,2	7,5
C18:1 c10	0,4	0,5	1,3
C18:2	2,4	5,6	4,8
C18:2 <i>izo</i>	0,9	0,9	1,0
<b>C18:2 9c,11 t</b>	<b>1,4</b>	<b>4,6</b>	<b>11,2</b>
<b>C18:2 (pozostałe CLA)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
C18:3	1,3	1,5	2,0
Inne	3,7	2,7	1,3

(KT) - kwasy tłuszczowe mleka owczego

(KT/M) – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika

(KT/M-CO<sub>2</sub>) – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

W ostatnim III etapie badań w Laboratorium Zakładu Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu przeprowadzono metodami *in vitro* oraz *in vivo* testy przeciwnowotworowe.

Testy aktywności antyproliferacyjnej metodą *in vitro* preparatów: KT (kwasy tłuszczowe mleka owczego), KT/M-CO<sub>2</sub> (kwasy tłuszczowe mleka owczego o zwiększonej koncentracji izomeru kwasu linolowego c9t11) oraz SI (syntetyczny izomer kwasu linolowego c9t11) wykonano wobec komórek dwóch ludzkich linii nowotworowych: raka jamy ustnej KB oraz białaczki promielocytarnej HL-60.

Komórki nowotworowe hodowane były w medium opti-MEM (KB) i RPMI 1640 (HL-60) z dodatkiem 5% FCS, 50 mg/ml streptomycyny, 50 U/ml penicyliny i 2mM glutaminy. Roztwory wyjściowe testowanych związków o stężeniu 1mg/ml przygotowywano *ex tempore* do każdego doświadczenia, rozpuszczając 1mg preparatu w 100µl DMSO + 900µl medium hodowlanego. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki testowano w stężeniach końcowych 100, 10, 1, 0,1 µg/ml. Badania wykonano przy użyciu testów SRB (KB) i MTT (HL-60), mierzących zahamowanie proliferacji komórek docelowych w 96-cio godzinnej hodowli *in vitro*. Wyniki testów

cytotoksycznych odczytywano metodą kolorymetryczną. Uzyskane wyniki aktywności cytotoksycznej testowanych preparatów przedstawiano w postaci ID<sub>50</sub> - dawka związku powodująca zahamowanie proliferacji 50% komórek nowotworowych oraz odsetka zahamowania proliferacji przez testowane preparaty w najwyższym stężeniu 100µg/ml (tabele 2,3).

Tabela 2

Aktywność antyproliferacyjna badanych związków wobec komórek ludzkiej linii raka jamy ustnej KB

Testowany preparat	ID <sub>50</sub> (µg/ml ± SD)	Zahamowanie proliferacji (% ± SD) w stężeniu 100µg/ml
KT	-	10,0 ± 0,9
KT/M-CO <sub>2</sub>	<b>40,1 ± 1,2</b>	<b>85,3 ± 9,0</b>
SI	51,5 ± 1,2	69,5 ± 6,4

KT – kwasy tłuszczowe mleka owczego

KT/M-CO<sub>2</sub> – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

SI – syntetyczny izomer C<sub>18:2</sub> c9, t11

Tabela 3

Aktywność antyproliferacyjna badanych związków wobec komórek ludzkiej linii białaczki promielocytarnej HL-60

Testowany preparat	ID <sub>50</sub> (µg/ml ± SD)	Zahamowanie proliferacji (% ± SD) w stężeniu 100µg/ml
KT	-	15,3 ± 1,1
KT/M-CO <sub>2</sub>	<b>30,9 ± 1,1</b>	<b>99,0 ± 1,0</b>
SI	55,0 ± 1,0	69,0 ± 2,0

KT – kwasy tłuszczowe mleka owczego

KT/M-CO<sub>2</sub> – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

SI – syntetyczny izomer C<sub>18:2</sub> c9, t11

Uzyskane metodą *in vitro* wyniki aktywności cytotoksycznej preparatu kwasów tłuszczowych mleka owczego o zwiększeniu koncentracji dienu c9t11 (KT/M-CO<sub>2</sub>) wskazują na jego wysoką zdolność do hamowania proliferacji komórek przebadanych linii nowotworowych (KB, HL-60). Aktywność antyproliferacyjną wobec testowanych linii komórek ludzkich nowotworów wykazał również syntetyczny izomer kwasu linolowego (SI) ale w mniejszym stopniu niż naturalne kwasy tłuszczowe wzbogacone w ten izomer. Dla kwasów tłuszczowych z tłuszczu mleka owczego nie wyznaczono dawki ID<sub>50</sub> jedynie w niewielkim procencie określono zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych.

W ramach tego samego etapu badań wykonano również testy aktywności antyproliferacyjnej preparatu KT/M-CO<sub>2</sub> wobec komórek nowotworowych raka sutka 16/C i białaczki P388, metodą *in vivo*.

Preparat podawano dootrzewnowo, w przypadku raka sutka 16/C dwukrotnie - w dniu wszczepienia nowotworu i w pierwszym dniu po wszczepieniu nowotworu, natomiast białaczki P388 jednorazowo - w dniu wszczepienia nowotworu. Dawka pojedyncza wynosiła 200mg/kg. Raka sutka 16/C podawano dosutkowo w postaci 20% zawiesiny w objętości 50µl/mysz. Białaczkę P3888 wstrzykiwano dootrzewnowo w liczbie 1 x 10<sup>6</sup> komórek/mysz. Badania prowadzono na myszach mieszańcach pierwszego pokolenia szczepów wsobnych BALB/c/iW x DBA/2iW (CD2F1) oraz myszach szczepu wsobnego C3H, samicach lub samcach w wieku 6-12 tygodni, ważących od 20 do 25 gramów. Doświadczenia prowadzono

w konwencjonalnych warunkach higienicznych zwierzyńca doświadczalnego (standard MD) z zachowaniem międzynarodowo przyjętych norm etycznych. Zwierzęta bytowały w standardowych klatkach (6 myszy na klatkę). W dniu „ZERO” eksperymentu przeprowadzano losową randomizację zwierząt. Obserwacje zwierząt prowadzono codziennie.

Głównym parametrem oceny działania przeciwnowotworowego w przypadku raka sutka 16/C był pomiar guzów umiejscowionych w tkance podskórnej w dwóch wymiarach: poprzecznym (a) i podłużnym (b). Do przeliczenia danych geometrycznych na masę w mg stosowano wzór:  $TW = a^2 \times b / 2$ .

Parametrem oceny działania przeciwnowotworowego w przypadku białaczki P388 było przedłużenie czasu przeżycia myszy leczonych ponad czas życia myszy kontrolnych, otrzymujących tylko sól fizjologiczną (ILS – increase in life-span, w %), obliczane na podstawie średniego czasu życia, wg równania:  $(T/C \times 100) - 100$  (%), gdzie T= AST (average survival time, średni czas przeżycia) myszy leczonych, a C= AST myszy kontrolnych.

Uzyskane w badaniach *in vivo* wyniki aktywności przeciwnowotworowej przedstawiono w tabelach 4 i 5.

Tabela 4

Białaczka P 388 wszczepiona myszom

Grupy	Długość życia myszy (dni)	Przedłużenie czasu życia zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej (%)
Kontrolna	11,3	-
Otrzymująca preparat KT/M-CO <sub>2</sub>	12,2	8

KT/M-CO<sub>2</sub> – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

Tabela 5

Objętość guzów (mm<sup>3</sup>) raka sutka myszy 16/C

Dzień	Grupa kontrolna	Grupa otrzymująca preparat KT/M-CO <sub>2</sub>	% zahamowania wzrostu guza w stosunku do grupy kontrolnej
7	60,9	39,4	36
9	162,0	86,3	47
13	468,5	322,0	31
15	772,3	437,6	43
17	980,3	612,0	38
20	2012,1	1078,6	46
22	1993,4	1270,8	36
24	2658,2	1822,2	31
27	3145	2675,3	22

KT/M-CO<sub>2</sub> – kwasy tłuszczowe po krystalizacji z mocznika i ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

Na podstawie uzyskanych wyników widać, że preparat kwasów tłuszczowych mleka owczego o zwiększonej koncentracji izomeru kwasu linolowego c9t11 (KT/M-CO<sub>2</sub>) w modelu mysiej białaczki P388 (tab. 4) przedłużył życie o 1 dzień (co należy uznać za wynik zadawalający), natomiast w przypadku guza sutka 16/C w stopniu statystycznie istotnym spowolnił tempo przyrostu jego masy.

Wskazuje to na dużą zdolność naturalnego preparatu z tłuszczu mleka owczego o zwiększonej koncentracji dienu c9t11 do hamowania procesów nowotworowych.

Przypuszczalnie obserwowane w niniejszych badaniach przeciwnowotworowe działanie preparatu z mleka owczego o zwiększonej koncentracji CLA spowodowane zostało silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi sprzężonych dienów kwasu linolowego lub ich zdolnością do oksydacji w komórkach nowotworowych do rodników o silnych właściwościach cytotoksycznych. Mogło być ono również spowodowane zdolnościami izomeru c9t11 do hamowania wytwarzania eikozanoidów stymulujących wzrost komórek oraz modulacją obronnych systemów komórkowych przez ich wpływ na funkcje limfocytów i makrofagów.

Badania na hamowanie wzrostu komórek nowotworowych nadal są kontynuowane.

Ponieważ izolacja czystego CLA z produktów naturalnych jest bardzo kosztowna, najczęściej otrzymuje się je na drodze syntetycznej. CLA będące kwasami tłuszczowymi wchodzi w skład tłuszczów podlegających w organizmie przemianom metabolicznym. Założyliśmy, że obecność innych nienasyconych kwasów tłuszczowych mogących być prekursorami CLA powinna stanowić istotny i korzystny element stosowanej mieszaniny. Dlatego też zamiast podejmowania żmudnej i drogiej metody wydzielenie czystego CLA opracowaliśmy metodę otrzymywania naturalnego preparatu z tłuszczu mleka owczego wzbogaconego w CLA i inne kwasy tłuszczowe będące jego prekursorami.

Opracowana metoda jest prosta i ekonomicznie opłacalna do stosowania na skalę przemysłową.

Na powyższy preparat zespół badawczy uzyskał 2 zgłoszenia patentowe.

Całość badań (od wykonania oznaczeń CLA, po otrzymanie preparatu i przetestowanie jego przeciwnowotworowego działania na liniach komórek nowotworowych) wykonana została w ramach 2 grantów finansowanych przez Komitet Badań Naukowych (5PO6EO26193, TO9BO931619) oraz 3 grantów wewnętrznych finansowanych przez Akademię Rolniczą we Wrocławiu (GW/101/99, GW102/00, GW/101/02).