

*Wprowadzenie:* Badania epidemiologiczne i liczne badania na zwierzętach wykazały, że kwas linolowy (LA) należący do niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, pobudza karcinogenezę i stymuluje wzrost guzów nowotworowych, lecz dokładny mechanizm jego działania nie jest wyjaśniony. W pilotażowych badaniach autorów wykazano pobudzający wpływ oleju z nasion wiesiołka, który zawiera 70 proc. LA i 10 proc. kwasu gamma-linolenowego (GLA), na aktywność angiogenną komórek raka płuca w teście skórnej angiogenezy. Zjawisko angiogenezy warunkuje wzrost guzów nowotworowych i przerzuty.

*Cel pracy:* Celem pracy było przebadanie wpływu LA na rozwój i unaczynienie doświadczalnego nowotworu u myszy (*Sarcoma L-1*, syngeniczny dla myszy Balb/c).

*Materiał i metody:* Komórki mięsaka mysiego L-1 wstrzykiwano śródskórnie uśpionym wodzianem chloralu myszom Balb/c, a następnie podawano doustnie LA rozpuszczony w 0,2-procentowym alkoholu etylowym, w dawce dobowej 3,5 mg, w objętości 25 mikrolitrów, przez 3 dni. Następnie myszy uśmiercano *Morbitem* i odczytywano liczbę nowo powstałych naczyń krwionośnych w mikroskopie operacyjnym. Wpływ LA na wzrost i ukrwienie mięsaka L-1 oceniano w grupie myszy, którym podskórnie wszczepiano 1 milion komórek mięsaka i karmiono je przez 14 dni ww. dawką badanego kwasu. Myszom grup kontrolnych podawano doustnie 0,2-procentowy wodny roztwór alkoholu etylowego.

*Wyniki:* W teście skórnej angiogenezy stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby nowo powstałych naczyń krwionośnych w grupach myszy karmionych LA w porównaniu z kontrolną. W grupach myszy karmionych przez 14 dni kwas linolowy statystycznie istotnie pobudzał wzrost i ukrwienie wszczepionych mięsaków L-1.

*Wniosek:* Pobudzenie wzrostu *Sarcoma L-1* przez kwas linolowy mogło mieć związek z pobudzeniem procesów angiogenezy.

*Słowa kluczowe:* kwas linolowy, angiogeneza, wzrost guza.

# Wpływ kwasu linolowego na wzrost mięsaka mysiego L-1, jego unaczynienie i aktywność angiogenną w teście skórnej angiogenezy

*The effect of linoleic acid on the growth and vascularity of L-1 Sarcoma in mice and on the cutaneous angiogenesis induced by tumour cells*

Ewa Sommer<sup>1</sup>, Ewa Skopińska-Różewska<sup>1</sup>, Henryk Skurzak<sup>2</sup>, Małgorzata Filewska<sup>1</sup>, Beata Białas<sup>1</sup>, Sylwester Sommer<sup>1</sup>

## WSTĘP

Liczne badania epidemiologiczne i doświadczalne na zwierzętach wskazują na istotną rolę tłuszczów w rozwoju procesu nowotworowego i w zjawisku przerzutów [1, 2, 3]. Znaczenie ma zarówno ilość tłuszczu, jak i jego skład [4, 5]. Szczególnie ważną rolę odgrywają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, zwane niezbędnymi, które nie są wytwarzane w organizmie i muszą być dostarczane w pokarmie. Należy do nich kwas linolowy (LA), nienasycony kwas tłuszczowy z rodziny n-6, znajdujący się w dużych ilościach w oleju słonecznikowym, sojowym, kukurydzianym i wiesiołkowym.

W wielu doświadczeniach *in vitro* opisano stymulujące działanie LA na wzrost linii hodowlanych ludzkich komórek nowotworowych oraz *in vivo* na wzrost i przerzuty wszczepionych guzów nowotworowych. U myszy karmionych dietą bogatą w LA, po wszczepieniu im komórek nowotworowych, obserwowano przyspieszenie wzrostu guzów sutka oraz powstawania przerzutów [6]. Także potomstwo myszy karmionych dietą o wysokiej zawartości tłuszczu pochodzącego z oleju kukurydzianego w ciągu swego życia statystycznie istotnie częściej zapadało na nowotwory układu rozrodczego [7]. Istnieją doniesienia dotyczące stymulacji inwazyjności *in vitro* komórek nowotworowych przez metabolity LA, prostanoidy, powstające drogą cyklooksigenazy i lipooksigenazy. Wykazano, że niektóre z nich mogą indukować lub nasilać wytwarzanie metaloproteaz, czynnych w procesach inwazyjności nowotworów i w procesie angiogenezy [8].

Kwasy tłuszczowe modulują proces karcinogenezy, wpływając na jej różne stadia

i mechanizmy [9]. Jednym z ważniejszych mechanizmów warunkujących rozwój guzów nowotworowych i ich przerzutów jest proces angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych [10]. Upřednie badania autorów wykazały pobudzające działanie oleju z wiesiołka, zawierającego ok. 70 proc. kwasu linolowego i 10 proc. kwasu gamma-linolenowego na proces angiogenezy indukowanej w skórze myszy przez komórki nowotworowe [11]. Na modelu tym czynniki uwalniane przez wszczepione komórki aktywują komórki śródbłonnków naczyń gospodarza, co stwarza sytuację podobną do istniejącej w procesie neowaskularyzacji ognisk pierwotnych i przerzutów.

W obecnej pracy postanowiono przebadać wpływ doustnego podawania myszom kwasu linolowego na wzrost i unaczynienie wszczepionego im mięsaka L-1. Oceniano unaczynienie guza pośrednio na podstawie zawartości w nim hemoglobiny (Hb). Przebadano także wpływ LA na angiogenezę indukowaną komórkami *Sarcoma L-1* w teście skórnym u myszy.

## MATERIAŁ I METODY

Używano myszy wsobnych Balb/c z hodowli własnej, 6-tygodniowych samców (doświadczenia z wszczepianiem guza) i samic (test angiogenezy skórnej), wagi ok. 20 g, pozostających na standardowej diecie (Murigran, woda filtrowana). Materiał zarodkowy myszy Balb/c oraz komórki mięsaka mysiego L-1 pochodziły z Centrum Onkologii w Warszawie. Komórki L-1 były utrzymywane *in vivo* poprzez kolejne przeszczepianie myszom (do 6 pasaży). Używano kwasu linolowego firmy Sigma nr kat.

<sup>1</sup> Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

<sup>2</sup> Zakład Immunologii Centrum Onkologii w Warszawie

Linoleic acid (LA) is an essential, dietary polyunsaturated n-6 fatty acid (PUFA), that is metabolised in the body by way of intermediate products to arachidonic acid, the precursor of two families of eicosanoids formed from cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated reactions. Fatty acids carry out many functions that are necessary for normal physiological function and good health. LA is present in large amounts in corn, sunflower, soy and evening primrose oils. Some recent epidemiological and clear experimental data now linked a high dietary intake of n-6 PUFAs, such as LA to increased risk for cancer of breast, colon and prostate. The precise mechanism of LA action on tumourigenesis is not clear. In our previous study we observed enhancing effect of evening primrose oil, which consists of 70% LA and 10% gamma linolenic acid (GLA) on cutaneous angiogenesis induced in mice after grafting tumour cells of various origin.

**Aim:** The object of the present study was to evaluate the influence of LA on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1 cells, and on the growth and vascularization of this tumour.

**Material and methods:** Mouse L-1 Sarcoma cells were grafted intradermally into Balb/c mice, fed subsequently LA dissolved in 0,2 % ethyl alcohol, in dose 3,5 mg per mouse/day, for 3 days. Three days after the cells grafting mice were sacrificed and newly formed blood vessels were counted in dissection microscope. The other groups of mice who were subcutaneously injected with 106 Sarcoma cells were fed LA for 14 days using daily doses as indicated above, or 0,2% ethyl alcohol (controls). After 14 days mice were killed, tumours were excised, weighted and the hemoglobin (Hb) concentration of tumours was estimated.

**Results:** We observed significant increase of the number of new vessels in mice fed LA in 3-day tumor angiogenesis tests. Tumors of LA fed mice presented, 14 days after cells grafting, significantly higher Hb content. Also, tumors excised from LA fed mice weighted significantly more than in controls.

**Conclusion:** Stimulation of tumour growth by LA may be connected with pro-angiogenic activity of this substance.

**Key words:** linoleic acid, angiogenesis, Sarcoma L-1, mice.

Tab. Wpływ kwasu linolowego na aktywność angiogeną komórek Sarcoma L-1 w teście skórnej angiogenezy u myszy

Średnia liczba nowo powstałych naczyń krwionośnych ±SE	
kontrola n = 30	kwas linolowy n = 26
24,37±0,76	32,34±1,30*

n – liczba testów

\* – p <0,01

L1751. Rozpuszczano go w 0,2 proc. alkoholu etylowym. Do preparatyki zawiesin komórek nowotworowych używano sit firmy Sigma nr kat. L. 77HO777.

### BADANIA WPŁYWU KWASU LINOLEWEGO NA WZROST MIĘSAKA L-1 U MYSZY

Komórki mięsaka mysiego w liczbie 1 miliona wszczepiano podskórnie myszom, po uprzednim ich uspieniu 3,6-procentowym wodzianem chloralu. Grupy myszy następnie karmione były przez 14 dni kwasem linolowym w dawce dobowej 3,5 mg w 25 mikrolitrach 0,2-procentowego wodnego roztworu alkoholu etylowego. Następnie myszy zabijano przy pomocy usypiającego preparatu Morbital i ważono wyizolowane guzy.

### ILOŚCIOWE OZNACZENIE ZAWARTOŚCI HEMOGLOBINY W GUZACH

Stosowana metoda jest modyfikacją metody opisanej dla wszczepów gąbki kolagenowej i Matrigelu wg Passanti et al. [12]. W skrócie, tkanka guza poddana była homogenizacji przy użyciu sonifikatora ultradźwiękowego (Virtis, USA), a następnie wirowaniu przez 25 min przy 2000 obr/min. Uzyskany w wyniku wirowania supernatant łączony był w ilości 20 mikrolitrów z 5 ml zmodyfikowanego odczynnika Drabkina. Po upływie ok. 5 min próbka była odczytywana w czytniku spektrofotometrycznym przy długości fali 570 nm. Próbę standardową

stanowiły kolejne rozcieńczenia wzorcowej hemoglobiny mysiej (Sigma).

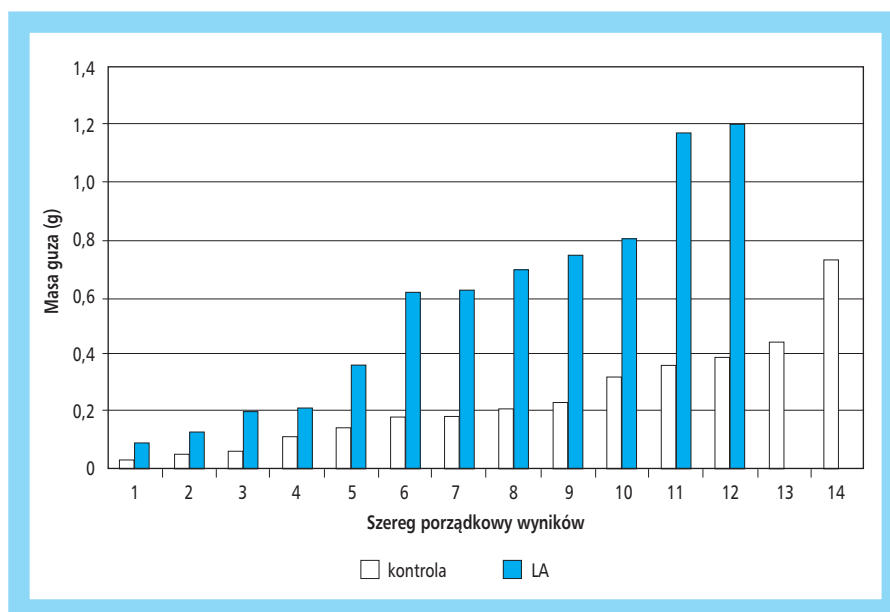
### TEST SKÓRNEJ ANGIOGENEZY INDUKOWANEJ KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI [13]

Myszom, po uprzednim uspieniu 3,6-procentowym wodzianem chloralu (0,2 ml do otrzewnowo) i ogoleniu skóry grzbietu wstrzykiwano śródskórnie komórki nowotworowe w liczbie 200 tys., zawieszone w 0,05 ml płynu Parkera (4–6 wszczepów u jednej myszy). Miejsce wstrzyknięcia uwidaczniano przez dodanie do zawiesiny komórek 0,1-procentowego błękitu trypanu. Podawanie doustne badanego leku rozpoczynano zaraz po wstrzyknięciu komórek i przez następne 2 dni. Po 3 dniach myszy zabijano przez zastosowanie usypiającego preparatu Morbital i po uwidocznieniu wewnętrznej strony skóry odczytywano liczbę nowo powstałych nowych naczyń krwionośnych w mikroskopie operacyjnym, przy 7-krotnym powiększeniu. Nowo powstałe naczynia krwionośne identyfikowano wg metody Sidky i Auerbacha [14].

Oceny statystycznej wyników dokonywano przy użyciu testów: t Studenta i U Man-Whitneya.

### WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tab. i na ryc. 1. i 2. Tab. przedstawia średnią liczbę nowo powstałych na-



Ryc. 1. Wpływ karmienia myszy LA na masę guza po 14 dniach

czyń indukowanych komórkami nowotworowymi w teście skórnej angiogenezy. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby naczyń krwionośnych u myszy, którym podawano kwas linolowy (test Studenta).

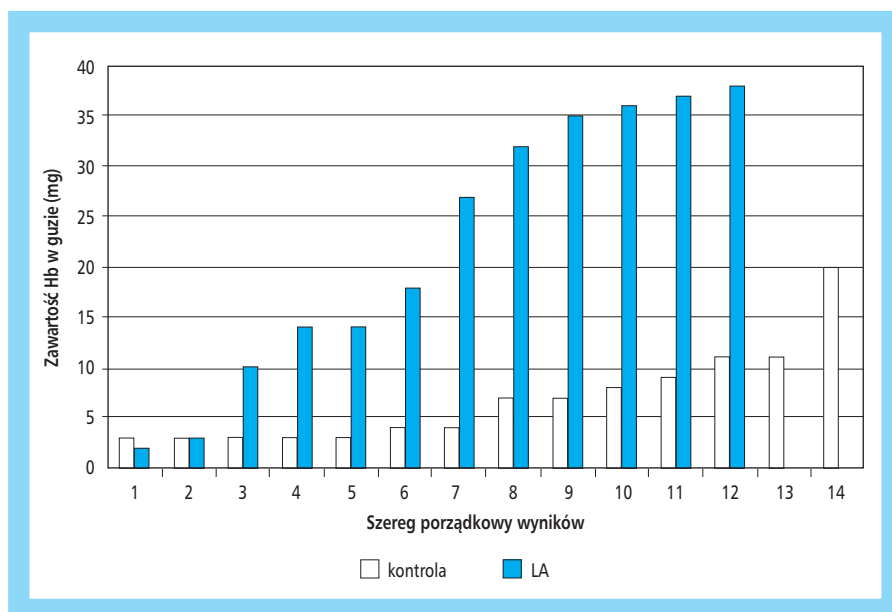
Kwas linolowy podawany myszom ze wszczepionym mięsakiem L-1 przez 14 dni (ryc. 1.) statystycznie istotnie pobudzał jego wzrost w porównaniu do wzrostu guzów w grupach myszy kontrolnych (mediana – 0,6135 g versus 0,1975 g). Kwas linolowy wpływał również pobudzająco na unaczynienie guza. Zawartość hemoglobiny w guzach u myszy, którym podawano LA była statystycznie istotnie wyższa niż w guzach myszy grup kontrolnych (mediana – 22,15 versus 5,65 ryc. 2.). Analiza rang przeprowadzona testem Manna Whitney wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami kontrolną i doświadczalną.

## OMÓWIENIE

Stymulujący wpływ LA na procesy nowotworowe obserwowano w badaniach epidemiologicznych i w licznych doświadczeniach na zwierzętach [15]. Nadmierna podaż w diecie kwasu linolowego jest związana ze zwiększeniem ryzyka powstawania raka sutka, jelita i prostaty u ludzi [1, 16]. Kwas linolowy obecny jest w dużych ilościach w olejach roślinnych – olej sojowy (53 proc.), olej słonecznikowy (67 proc.), olej kukurydziany (50 proc.), olej wiesiołkowy (70 proc.). Kwas linolowy pobudza karcinogenezę i zwiększa liczbę przerzutów wpływając na różne stadia ich powstawania. Jest on metabolicznym prekursorem kwasu arachidonowego. W procesie nowotworzenia bardzo istotną rolę odgrywają metabolity kwasu arachidonowego (prostanoidy), powstające zarówno drogą cyklooksygenazy (prostaglandyny, tromboksany, prostacyklina), jak i drogą lipoksygenazy (leukotrieny, lipoksyny). Zwiększony poziom prostaglandyn stwierdzono w wielu guzach nowotworowych [17, 18]. Wykazano, że prostaglandyny wpływają na wzrost guzów poprzez stymulację proliferacji komórek i działanie na układ immunologiczny.

Metabolit kwasu linolowego, powstający drogą lipoksygenazy – 12 HETE (kwas 12-hydroksyeicosatetraenowy) zwiększa inwazyjność komórek nowotworowych, co związane jest z indukcją kolagenazy typu IV [19].

Stwierdzono także, że kwas 12-HETE odgrywa szczególną rolę przy powstawaniu przerzutów, zwiększa adhezję komórek nowotworowych do komórek śródbłonna, stymuluje rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych w macierzy zewnątrzkomórkowej i zwiększa ich ruchliwość [20]. Wykazano także, że kwas 12 HETE jest czynnikiem proangiogennym i hamuje apoptozę [21]. Inny metabolit kwasu arachidonowego, prostaglandyna grupy 2 (PGE2) także posiada właściwości proangiogenne [22]. Wyniki naszych badań potwierdzają wyniki cytowanych autorów i wskazują na udział proangiogennego działania LA w jego aktywności pronowotworowej.



Ryc. 2. Wpływ karmienia myszy LA na zawartość hemoglobiny w guzie

Praca finansowana z tematu 4/4 działalności statutowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

## PIŚMIENNICTWO

- Bartsch H, Nair J, Owen R. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2209-18.
- Doll R, Peto R. The causes of cancer quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-208.
- Welsch C. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 192-202.
- Fay M, Freedman L, Clifford CK, Midthune P. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumours in rodents: a review. *Cancer Res* 1997; 57: 3979-88.
- Tannebaum A, Silverstone H. Nutrition in relation to cancer. *Adv Cancer Res* 1953; 1: 451-65.
- Rose D, Hatala MA, Connolly J, Rayburn J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res* 1993; 53: 4686-90.
- Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n-6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9372-7.
- Liu X, Connolly JM, Rose D. Eicosanoid as mediators of linoleic acid stimulated invasion and type-IV-collagenase production by a metastatic human breast-cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 145-52.
- Walker B, Kurth L. Multigenerational effect of dietary fat carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1997; 57: 4162-3.
- Folkman J. What is evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- Sommer E, Skopińska-Różewska E, Filewska M. Wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych n-6 zawartych w oleju z wiesiołka na reakcję skórnej angiogenezy indukowanej u myszy komórkami nowotworowymi i limfatycznymi. *Zbiór prac III Sympozjum nt. Olej z nasion wiesiołka i inne oleje zawierające kwasy n-6 lub n-3 w profilaktyce i terapii* 1998; 225-229.
- Passanti A, Taylor R, Pili R, Long P, Haney JA, Pacily R, Grant DS, Martin G. A simple quanti-

tative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agent using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992; 67: 519-28.

- Skopińska-Różewska E, Krotkiewski M, Sommer E, et al. Inhibitory effect of shark liver oil on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1, human urinary bladder and human kidney tumour cells. *Oncology Reports* 1999; 6: 1341-4.
- Sidky Y, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: A quantitative and sensitive assay of the graft-vs.-host reaction. *J Exp Med* 1975; 141: 1084-1100.
- Rose D, Boyar AP, Wynder EL. International comparisons of mortality rates for cancers of breast, ovary, prostate and colon and per capita food consumption. *Cancer* 1986; 58: 2363-71.
- Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Clarke R, Lippman M. High-fat diet during pregnancy increases breast cancer risk in rat. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1821-7.
- Noguchi M, Rose D, Eavashi M, Miyazaki J. The role of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors in breast carcinoma. *Oncology* 1995; 52: 265-71.
- Lupulescu A. Enhancement of carcinogenesis by prostaglandins in male Swiss mice. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 97-106.
- Chen Y, Duniec Z, Liu B, Hagmann W, Gao X, Shinoji K, Marnett L, Johnson C, Honn K. Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res* 1994; 54: 1574-9.
- Connolly J, Rose D. Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Lett* 1998; 132: 107-12.
- Nie D, Tang K, Diglio C, Honn K. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate lipoxygenase. *Blood* 2000; 95: 2304-11.
- Form D, Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 214-8.

## ADRES DO KORESPONDENCJI

prof. dr hab. n. med. Ewa Skopińska-Różewska  
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii  
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc  
ul. Płocka 26  
01-138 Warszawa  
e-mail: ewaskop@ hotmail.com