

Ocena sekrecji IL-6 przez komórki nowotworowe jelita grubego traktowane kwasem fitynowym

Evaluation of IL-6 secretion by colon cancer cells treated with phytic acid

Beata Parfiniewicz, Ludmiła Węglarz, Andrzej Hollek

STRESZCZENIE

WSTĘP

Szereg danych wskazuje, że interleukina-6 (IL-6) może odgrywać potencjalną rolę w patogenezie raka jelita grubego. W ciągu ostatnich lat szczególną uwagę naukowców zwraca aktywność przeciwnowotworowa kwasu fitynowego (IP6), ufosforylowanego węglowodanu, składnika diety bogatobłonnikowej. Pojawiły się sugestie, że może on modulować przebieg reakcji odpornościowych i stanów zapalnych między innymi poprzez regulację syntezy cytokin takich jak IL-6. Celem pracy była ocena wpływu IP6 na sekrecję IL-6 przez komórki nowotworowe jelita grubego linii Caco-2.

MATERIAŁ I METODY

Komórki linii Caco-2 eksponowano na działanie IP6 w stężeniach 1,0; 2,5; 5,0 mM przez 1; 6; 12 i 24 godziny. Oznaczenie stężenia IL-6 w hodowlach przeprowadzono przy użyciu testu ELISA, natomiast do oznaczenia stężenia białka zastosowano metodę Bradforda. Stężenie IL-6 wyrażono w pg/mg białka komórek.

WYNIKI

Stwierdzono, że transformowane komórki nabłonkowe jelita grubego linii Caco-2 wykazują konstytutywną sekrecję IL-6, utrzymującą się na stałym poziomie w czasie trwania doświadczenia. IP6 posiada zdolność do zmniejszania tej sekrecji w sposób zależny od jego stężenia i czasu działania na komórki.

WNIOSKI

Wyniki badań sugerują, że IP6 obecny w świetle jelita może wywierać efekty immunoregulatorowe związane ze zmianami sekrecji IL-6 w komórkach nabłonka jelitowego.

Katedra i Zakład Biochemii,
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM
w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

dr n. biol. Beata Parfiniewicz
Katedra i Zakład Biochemii,
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM
w Katowicach
41-200 Sosnowiec,
ul. Narcyzów 1
tel. (32) 364 10 72
e-mail: bparfiniewicz@sum.edu.pl

Ann.Acad.Med.Siles. 2009, 63, 6, 23-31
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

IL-6, kwas fitynowy, komórki Caco-2

ABSTRACT

BACKGROUND

Series of evidences have shown that interleukin-6 (IL-6) could play an important role in the pathogenesis of colon cancer. Inositol hexaphosphate (IP6) is a naturally occurring polyphosphorylated carbohydrate, found in many plant sources and in certain high-fiber diets. Over the past few years interest in IP6 has stemmed mostly from its potentially important antineoplastic activity against various types of cancer, including colon cancer. Moreover, it was pointed out that IP6 has ability to act on the host immune functions and inflammatory processes by controlling the synthesis of cytokines such as IL-6. The aim of this study was to evaluate the influence of IP6 on IL-6 secretion by malignant epithelial colorectal Caco-2 cells.

MATERIAL AND METHODS

The Caco-2 cells were treated with IP6 at the concentrations of 1.0; 2.5; 5.0 mM for 1; 6; 12 and 24 hours. The level of IL-6 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The concentration of IL-6 was related to the amount of total cell protein which was estimated by the Bradford method (pg/mg).

RESULTS

It was found that colorectal Caco-2 cells constitutively secreted IL-6 at the constant level during 24 hour culture. IP6 down-regulated IL-6 secretion in a dose and time dependent manner.

Conclusion old

The present findings demonstrate that IP6 in the lumen of the large intestine may play an immunoregulatory role by inducing changes in IL-6 secretion by epithelial colon cells.

KEY WORDS

IL-6, phytic acid, Caco-2 cells

WSTĘP

Nowotwory złośliwe, w tym rak jelita grubego, stanowią istotny problem społeczny ze względu na stale rosnącą liczbę zachorowań i mały odsetek trwałych wyleczeń [1].

W etiopatogenezie raka jelita grubego uwzględnia się stany zapalne związane z chronicznymi zapaleniami błony śluzowej jelita grubego, co wskazuje na rolę nadreaktywności układu immunologicznego w rozwoju procesu nowotworowego, czemu towarzyszy zwiększone wytwarzanie prozapalnych cytokin [2].

Interleukina-6 (IL-6) jest cytokiną prozapalną wykazującą różnorodne działanie biologiczne [3, 4]. Dotychczasowe badania wykazały, że IL-6 może być współodpowiedzialna za powstawanie i rozwój wielu chorób takich

jak: szpiczak mnogi, białaczki szpikowe, rak prostaty, rak pęcherza moczowego, rak nerki, rak jajnika, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza, jak również przewlekłe choroby zapalne jelit, tj. choroba Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego [5, 6, 7, 8].

W ostatnich latach wykazano, że interleukina-6 może odgrywać potencjalną rolę w patogenezie raka jelita grubego. Jej stężenie w surowicy chorych z nowotworem tej tkanki korelowało dodatnio z rozmiarem guza, natomiast dla komórek nowotworowych hodowanych *in vitro* IL-6 pełniła funkcję czynnika wzrostu [9]. Stwierdzono, że ułatwia ona wzrost guza poprzez hamowanie procesu apoptozy komórek nowotworowych oraz indukuje angiogenezę w obrębie guza. Wykazano jej udział w indukcji wzrostu nowotworu na drodze auto- i parakrynej [10]. Wyniki najnowszych ba-

dań potwierdzają znaczenie IL-6 jako czynnika rokowniczego raka jelita grubego [11]. Esfanok i wsp. [11] dowiedli, że stadium zaawansowania tego nowotworu korelowało nie tylko ze stężeniem IL-6 w surowicy chorych, ale także ilością tej cytokiny w tkance nowotworowej jelita grubego.

Ciągle poszukuje się nowych związków mogących znaleźć zastosowanie w profilaktyce i leczeniu nowotworów, w tym nowotworów jelita grubego.

Kwas fitynowy (IP6) jest ufosforylowanym węglowodanem występującym powszechnie w przyrodzie. Szczególnie obficie występuje w roślinach strączkowych i oleistych oraz ziarnach zbóż i innych produktach o dużej zawartości włókna pokarmowego. W znacznie mniejszych ilościach znajduje się w organizmach ssaków. Ze względu na silną zdolność chelatacyjną, IP6 uważany był dawniej za czynnik antyodżywczy wpływający na obniżenie biodostępności zawartych w diecie aminokwasów i pierwiastków takich jak wapń, cynk i żelazo [12]. Jednakże późniejsze badania zaprzeczyły tym opiniom i ujawniły szereg korzystnych wpływów IP6 na organizm człowieka takich jak zapobieganie kamicy nerkowej, agregacji płytek krwi, obniżanie stężenia cholesterolu i innych frakcji lipidowych w osoczu krwi [13, 14].

W ostatnich latach szczególną uwagę naukowców zwróciła jego aktywność przeciwnowotworowa. Skuteczność IP6 w zakresie działania terapeutycznego jak i prewencyjnego w odniesieniu do różnych nowotworów, w tym raka jelita grubego była obserwowana w badaniach *in vitro* i *in vivo* [12, 13, 14]. Dotychczas nie wyjaśniono jednak w pełni mechanizmów takiego działania IP6. Sugeruje się, że związek ten może oddziaływać na różne typy komórek według odmiennych mechanizmów. Wykazano, że IP6 może wpływać na cykl komórkowy, ekspresję genów, angiogenezę i przerzutowanie nowotworów, jak również na szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i hamowanie tworzenia wolnych rodników tlenowych [15, 16, 17].

Badania doświadczalne nad IP6 dostarczyły również dowodów, że może on modulować przebieg reakcji odpornościowych i stanów zapalnych, między innymi poprzez regulację syntezy cytokin takich jak IL-6 [16, 18].

Celem pracy była ocena wpływu kwasu fitynowego na sekrecję interleukiny-6 przez trans-

formowane komórki nabłonkowe jelita grubego Caco-2 w zależności od jego stężenia i czasu działania.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2, wywodzącej się z gruczolakoraka jelita grubego (*human colon adenocarcinoma*), która została zakupiona w *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Dept. Human Animal Cell Cultures*.

Do badań użyto komórek pochodzących z 43-47 pasażu. Komórki hodowano standardowo w pożywce RPMI 1640 (Sigma, Germany) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej FBS (GIBCO BRL, Germany) oraz antybiotyków tj. penicyliny (Sigma, Germany) i streptomycyny (Sigma, Germany) w inkubatorze firmy Nuair NU-4750 (USA), który zapewniał warunki stałej temperatury (37°C), stałej wilgotności powietrza wynoszącej 95% i atmosferę powietrza wzbogaconą w 5% CO₂. Przed właściwym doświadczeniem, komórki linii Caco-2 hodowano w polistyrenowych naczyniach o powierzchni 25 cm², wyposażonych w filtry bakteriologiczne (Nunc EasyFlasks™ Nunclon™Δ, Nalge Nunc International, Denmark), a ich pasażowanie odbywało się z zastosowaniem 0,25% roztworu trypsyny (GIBCO BRL, Germany) z dodatkiem 1 mM EDTA × 4Na (Life Technologies, Germany).

W celu traktowania komórek kwasem fitynowym, zastosowano jego sól sodową wyizolowaną z kukurydzy (phytic acid, sodium salt from Corn, Sigma, Germany). Po rozpuszczeniu naważki IP6 w wodzie apirogennej i dejonizowanej oraz ustabilizowaniu pH do 7,4, roztwór przefiltrowano przez filtr bakteriologiczny. Z roztworu wyjściowego IP6 przygotowano roztwory o końcowych stężeniach: 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM wykonując odpowiednie rozcieńczenia pozbawioną surowicy pożywką RPMI 1640 z antybiotykami.

W celu oceny sekrecji IL-6 przez komórki Caco-2, komórki wysiewano na 24-dołkową płytkę hodowlaną (firmy Nunc, Denmark) w liczbie 1×10⁵ komórek/1,9 cm², po uprzednim ocenieniu ich żywotności z wykorzystaniem 0,4% błękitu trypanu (Sigma, Germany). Żywotność komórek wynosiła 98%. Przez pierwsze trzy doby komórki hodowano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem su-

rowicy bydłowej, penicyliny i streptomycyny, a następnie pożywkę wymieniano na medium o podobnym składzie lecz pozbawione surowicy i prowadzono w nim hodowlę przez następną dobę. W piątej dobie, do hodowli komórek wprowadzano pożywkę RPMI 1640 z antybiotykami i 10 mM buforem Hepes (Sigma, Germany) oraz IP6 o stężeniach 1,0 mM, 2,5 mM i 5,0 mM. Kontrolę stanowiły komórki nie traktowane IP6.

Materiał do analizy, tj. medium hodowlane i lizaty komórkowe zbierano po 1, 6, 12 i 24 godzinach od momentu wprowadzenia do hodowli roztworów IP6. Stężenie IL-6 w medium hodowlanym oznaczono immunoenzymatyczną metodą ELISA za pomocą zestawu „Quantikine – Human IL-6 Immunoassay” (R&D Systems, Minneapolis, USA), a otrzymane wyniki wyrażono w pg/ml w oparciu o krzywą kalibracyjną sporządzoną dla wzorca badanej cytokiny dołączonego do zestawu. Czulość testu wynosiła poniżej 0,7 pg/ml.

Lizaty komórek uzyskano po potraktowaniu komórek przyczepionych do dna dołków 0,2% roztworem SDS (dodecylsulfan sodu, POCH, Poland). Lizaty zamrażano w -70°C , a następnie oznaczano w nich stężenie białka komórkowego zgodnie z protokołem zamieszczonym w specyfikacji odczynnika Bradforda (Sigma, Germany) w modyfikacji dla płytek 96-dołkowych. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 595 nm stosując czytnik

MRX Revelation (firma Dynex, USA, oprogramowanie DYNEX™ Software wersja 4.25). Stężenia białka w poszczególnych próbkach wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej. Stężenie IL-6 (pg/ml) odniesiono do całkowitego białka komórkowego (mg/ml), wyrażając wyniki w pg IL-6 na mg białka komórkowego (pg/mg).

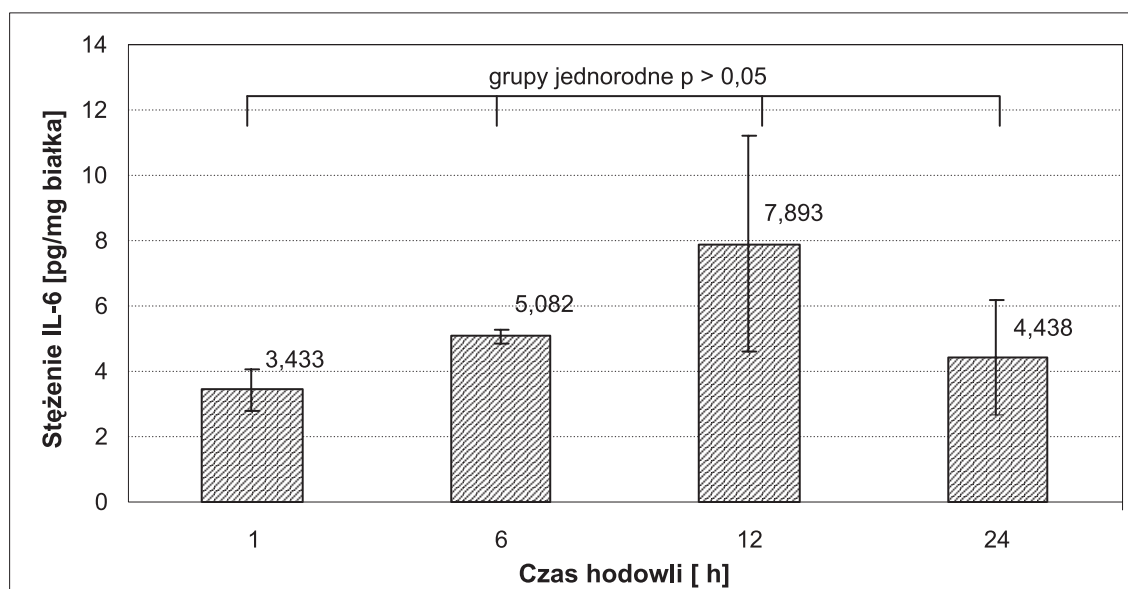
ANALIZA STATYSTYCZNA

Statystyczną ocenę wyników przeprowadzono dla modelu z powtarzającymi wynikami (niezależne trzykrotne powtórzenia) z wykorzystaniem średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego (SD) oraz jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadkach gdy ANOVA dała wynik statystycznie istotny, porównań wielokrotnych dokonywano testem Duncana. Testy wykonano na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ z użyciem programu Statistica 7.0.

WYNIKI

Stężenie IL-6 w hodowlach komórek Caco-2 suplementowanych IP6 w stężeniach 1,0; 2,5; 5,0 mM oraz w hodowlach kontrolnych nie zawierających tego związku oznaczono metodą ELISA.

Uzyskane wyniki zanalizowano statystycznie biorąc pod uwagę wpływ różnych stężeń IP6



Rycina 1. Sekrecja IL-6 przez komórki Caco-2 nie traktowane IP6 (kontrola) w różnych czasach prowadzenia hodowli.
Figure 1. IL-6 secretion by control (not treated with IP6) Caco-2 cells at various times of cells culturing.

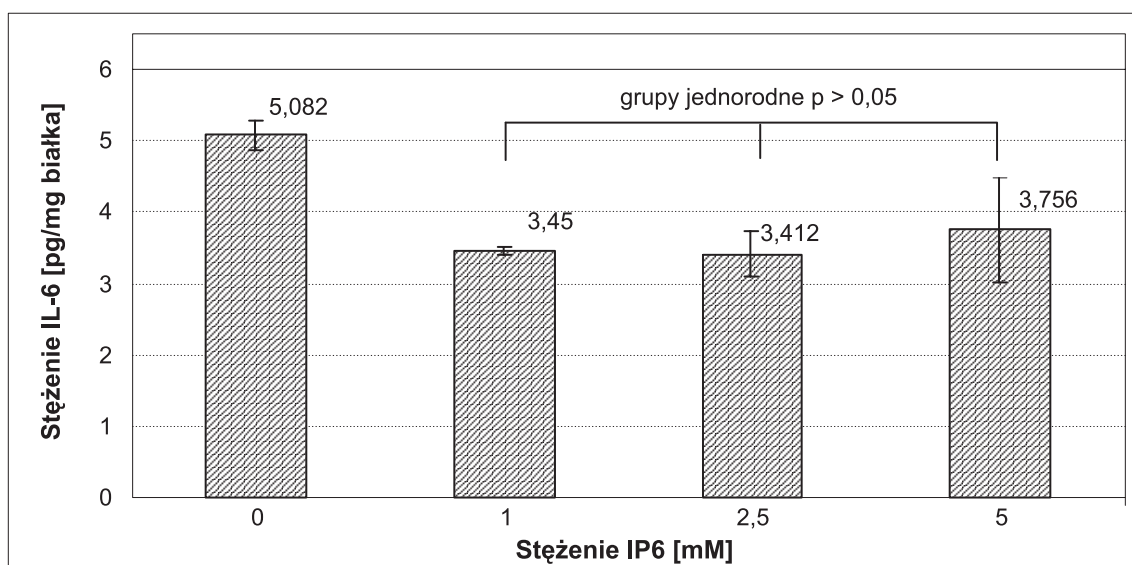


Rycina 2. Sekrecja IL-6 przez komórki Caco-2 w hodowli kontrolnej i w hodowlach traktowanych 1,0; 2,5; 5,0 mM IP6 przez 1 godzinę.
Figure 2. IL-6 secretion by control and incubated with 1.0; 2.5; 5.0 mM IP6 Caco-2 cells for 1 hour.

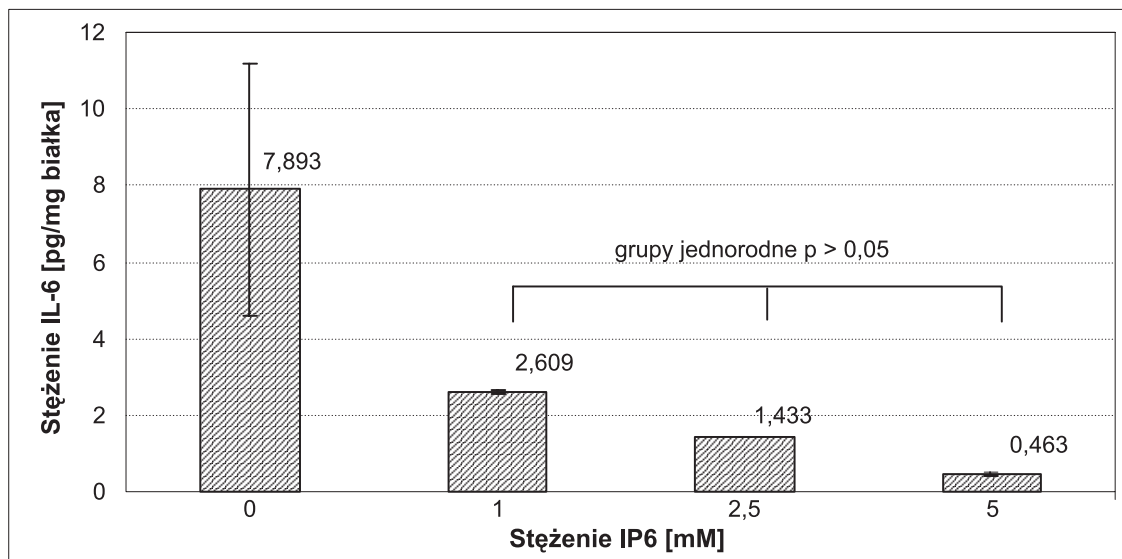
jak również wpływ czasu jego oddziaływania na badane komórki. Badania ujawniły, że kolonocyty Caco-2 posiadają zdolność konstytutywnej syntezy i wydzielania IL-6. Analiza statystyczna przeprowadzona testem ANOVA wykazała, że średnie arytmetyczne stężeń IL-6 w przeliczeniu na ilość białka komórkowego w hodowlach kontrolnych podczas kolejnych godzin prowadzenia hodowli nie różniły się istotnie statystycznie (ryc. 1). Konstytutywna

sekrecja IL-6 kształtowała się na poziomie 3,4-7,9 pg/mg białka. Stwierdzono natomiast, że wprowadzenie kwasu fitynowego do hodowli komórkowych spowodowało zmiany w sekrecji IL-6 w porównaniu z hodowlą nie traktowaną tym związkami (ryc. 2-5).

IP6 w stężeniach 1,0; 2,5; 5,0 mM wywoływał zmniejszanie sekrecji IL-6 przez komórki Caco-2 (ryc. 2-5), jedynie 1-godzinne oddziaływanie badanego czynnika w stężeniu 1mM



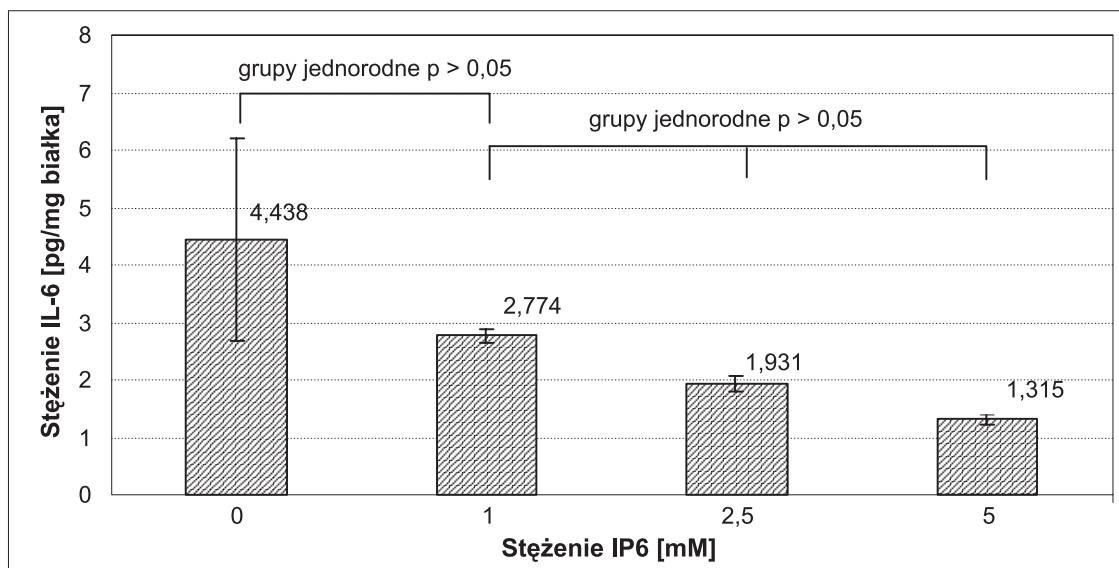
Rycina 3. Sekrecja IL-6 przez komórki Caco-2 w hodowli kontrolnej i w hodowlach traktowanych 1,0; 2,5; 5,0 mM IP6 przez 6 godzin.
Figure 3. IL-6 secretion by control and incubated with 1.0; 2.5; 5.0 mM IP6 Caco-2 cells for 6 hours.



Rycina 4. Sekrecja IL-6 przez komórki Caco-2 w hodowli kontrolnej i w hodowlach traktowanych 1,0; 2,5; 5,0 mM IP6 przez 12 godzin.
 Figure 4. IL-6 secretion by control and incubated with 1.0; 2.5; 5.0 mM IP6 Caco-2 cells for 12 hours.

stymulowało ją (ryc.2). Wyższe stężenia IP6 hamowały wydzielanie IL-6, przy czym statystycznie znaczne zmniejszenie sekrecji obserwowano po dłuższym czasie działania IP6, tj. po 12 i 24 godzinach (12 h i 24 h) (ryc. 4-5). Nie wykazano proporcjonalnych zmian w sekrecji IL-6 przez komórki Caco-2 zależnych od czasu działania IP6. Wydzielanie tej cytokiny pod wpływem 2,5 i 5,0 mM IP6 zwią-

zało się w wyniku wydłużenia czasu inkubacji z 1 godziny do 6 godzin, po czym zmniejszało się wyraźnie w 12 i 24 godzinie trwania hodowli (ryc. 2-5). Stężenie wydzielonej IL-6 po 24 godzinach było mniejsze niż po 1 godzinie inkubacji komórek z 1,0 i 5,0 mM IP6, a w przypadku zastosowania 2,5 mM IP6 nie wykazało istotnych statystycznie różnic w stosunku do ilości IL-6 uwalnianej po 1 godzinie inkubacji (ryc. 2-5).



Rycina 5. Sekrecja IL-6 przez komórki Caco-2 w hodowli kontrolnej i w hodowlach traktowanych 1,0; 2,5; 5,0 mM IP6 przez 24 godziny.
 Figure 5. IL-6 secretion by control and incubated with 1.0; 2.5; 5.0 mM IP6 Caco-2 cells for 24 hours

DYSKUSJA

W przedstawionej pracy zbadano sekrecję IL-6 przez transformowane komórki nabłonkowe jelita grubego linii Caco-2, które hodowano w obecności kwasu fitynowego (IP6).

Shirota i wsp. [19] badając wycinki tkankowe pochodzące z przewodu pokarmowego człowieka wykazali, że komórki nowotworowe jelita grubego wydzielają większe ilości IL-6 w porównaniu z prawidłowymi kolonocytami. Ponadto stwierdzili dwa razy większą ekspresję mRNA dla komórkowego receptora IL-6 w tkance nowotworowej w odniesieniu do prawidłowego nabłonka jelita grubego.

Badania dotyczące wydzielania IL-6 przez komórki nowotworowe jelita grubego były również prowadzone z zastosowaniem różnych linii komórkowych. Brozek i wsp. [20] stosowali jako model linie Caco-2/AQ, COGA-1A, COGA-13 do badań ekspresji mRNA i ilości białka IL-6 technikami odpowiednio RT-PCR i ELISA. Wykazali oni, że w liniach komórkowych ludzkiego raka jelita grubego pochodzących od guzów o średnim i wysokim stopniu zróżnicowania (Caco-1/AQ, COGA-1A) występuje niska ekspresja IL-6, a jej wydzielanie jest tylko w niewielkim stopniu podatne na czynniki stymulujące. Natomiast w komórkach wywodzących się od niezróżnicowanych guzów (COGA-13), ekspresja IL-6 jest zdecydowanie większa, a synteza tej cytokiny podlega efektywnej stymulacji przez IL-1 β . Używając tych samych metod, Legrand-Poels i wsp. [21] badali poziom sekrecji IL-6 w transformowanych liniach komórkowych HeLa i HTM-29, stwierdzając w pierwszej z nich dużą produkcję IL-6 w odpowiedzi na stymulację TNF- α i IL-1 β , natomiast w drugiej – brak wydzielania IL-6.

W przedstawionej pracy jako modelu doświadczalnego użyto komórek linii Caco-2 pochodzących od raka gruczołowego okrężnicy. W postaci zróżnicowanej Caco-2 wykazują morfologiczne i funkcjonalne podobieństwo do prawidłowych komórek nabłonkowych jelita, natomiast w postaci niezróżnicowanej stanowią model tkanki nowotworowej jelita grubego i są wykorzystywane w badaniach aktywności metabolicznej komórek nowotworowych.

Jung i wsp. [22] oceniali zdolność kolonocytów linii Caco-2, T-84 i SW620 do ekspresji cytokin. Stwierdzili oni, że badane linie komórkowe charakteryzują się ekspresją mRNA dla

IL-8 i TGF- β 1, a nie wykazują ekspresji wielu innych cytokin, w tym IL-6. Autorzy sugerują, że brak wydzielania IL-6 przez linie transformowane może wynikać z ich pochodzenia od prekursorów pozbawionych tej zdolności, a więc nie jest spowodowany transformacją nowotworową. Z kolei wyniki badań prowadzonych przez Węglarz i wsp. [23] wykazały zdolność komórek linii Caco-2 do konstytutywnej syntezy IL-6, a także IL-8. Jednak poziom sekrecji IL-6 przez te komórki był niski, osiągał wartość $8,81 \pm 0,32$ pg/mg białka komórkowego.

W przedstawionej pracy również stwierdzono, że komórki linii Caco-2 posiadają zdolność syntezy IL-6, a poziom sekrecji tej cytokiny jest niski. Jej stężenie w hodowlach kontrolnych osiągało wartości od 3,44 do 7,89 pg/mg białka komórek.

Naukowcy wciąż poszukują nowych związków mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu i profilaktyce nowotworów jelita grubego. Jednym z nich może być kwas fitynowy (IP6). Związek ten jest naturalnie występującym, ufosforylowanym węglowodanem, pochodną inozytolu. Występuje powszechnie w roślinach strączkowych i oleistych, oraz ziarnach zbóż i innych produktach o dużej zawartości włókna pokarmowego. W organizmach ssaków jest zawarty w znacznie mniejszych ilościach. Stężenie IP6 w jelicie grubym człowieka mieści się w zakresie 0,57-4,0 μ M na 1 gram treści pokarmowej [13, 14, 15, 16].

Obecnie większość badań jest ukierunkowanych na poznanie dokładnego mechanizmu działania oraz możliwości wykorzystania kwasu fitynowego w leczeniu i prewencji nowotworów. W doświadczeniach prowadzonych na modelu szczurów rasy F344 stwierdzono, że IP6 wpływa hamująco na kancerogenezę w jelicie grubym na etapie zarówno preinicyjacji jak i postinicyjacji [12, 24].

Verghese i wsp. [25] stwierdzili, że IP6 obniża ekspresję antygenu jądrowego komórek proliferujących oraz chroni przed rozwojem ognisk dysplastycznych w kryptach jelitowych normalizując jednocześnie parametry morfometryczne tych ognisk u szczurów z indukowanym chemicznie nowotworem jelita grubego. Ponadto zaobserwowali oni zmiany zachodzące w komórkach Caco-2 pod wpływem IP6 świadczące o jego zdolności do indukowania apoptozy, takie jak fragmentacja DNA czy wzrost uwalniania dehydrogenazy mleczanowej. W przeprowadzonych uprzednio

w naszym zespole badaniach, proapoptotyczne działanie kwasu fitynowego na komórki Caco-2 manifestowało się indukcją apoptozy wyrażoną zwiększeniem stosunku transkryptów Bax/Bcl-2, uszkodzeniami degradacyjnymi DNA, a także aktywacją kaspasy-3 [26].

W rozważaniach na temat mechanizmów przeciwnowotworowego działania IP6, wskazuje się, iż poza bezpośrednim wpływem na komórki nowotworowe, oddziałuje on na funkcje immunologiczne organizmu. Stwierdzono bowiem, że IP6 wzmacnia aktywność komórek NK u szczurów z indukowanym chemicznie nowotworem jelita grubego u których obserwowano odwrotną zależność pomiędzy aktywnością NK i rozmiarami guza oraz zmniejszanie wielkości guza wraz z towarzyszącym wzrostem aktywności NK [27]. W badaniach oddziaływania IP6 na neutrofile związek ten okazał się modyfikować uwalnianie IL-8 [18]. Wyniki tych badań wykazały, że IP6 w stężeniach 100 i 250 μ M posiada stymulujący wpływ na wydzielanie IL-8 oraz nasila pobudzające działanie LPS na jej uwalnianie przez neutrofile. Nie stwierdzono jednak jednoznacznego wpływu IP6 na sekrecję IL-6 przez te komórki.

Wyniki badań przedstawione w prezentowanej pracy wskazują, że IP6 w stężeniach 1,0, 2,5 i 5,0 mM obniża poziom sekrecji IL-6 w komórkach linii Caco-2 za wyjątkiem 1 mM IP6 w czasie 1 godziny inkubacji. Efekt tego działania jest zależny od stężenia IP6 oraz czasu jego oddziaływania na komórki. Najmniejsze ilości IL-6 były wydzielane przy zastosowaniu 5,0 mM IP6 oraz po 12 godzinach i 24 godzinach jego działania. Współdziałanie tych dwóch czynników nasilało hamujący wpływ badanego związku na wydzielanie IL-6 przez

komórki linii Caco-2. Im wyższe stężenie kwasu fitynowego zastosowano oraz dłuższy czas inkubacji komórek z IP6, tym większy był hamujący efekt działania tego związku na wydzielanie IL-6. Jednak w niektórych przypadkach analiza statystyczna wykazała brak różnic istotnych statystycznie między ilością IL-6 w hodowlach eksponowanych na określone stężenia IP6 w różnych czasach jego działania. Najmniejsze stężenie IL-6 oznaczone w hodowlach traktowanych IP6 wynosiło $0,463 \pm 0,048$ pg/mg w porównaniu do $7,893 \pm 3,210$ pg/mg białka komórek kontrolnych, co jednoznacznie może wskazywać na właściwości immunoregulatorowe IP6 w odniesieniu do komórek nabłonka jelitowego.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują więc, że IP6 obecny w świetle jelita może aktywnie uczestniczyć w procesach zapalnych poprzez zmniejszanie uwalniania prozapalnej IL-6 przez komórki nabłonkowe, stąd ograniczanie lub zapobieganie inicjacji i/lub propagacji przewlekłych stanów zapalnych na powierzchni śluzówki jelitowej.

WNIOSKI

- 1) Kwas fitynowy wywołuje zmiany w konstytutywnej sekrecji IL-6 przez komórki linii Caco-2 zależne od jego stężenia i czasu oddziaływania. Zmiany te objawiają się zmniejszonym wydzielaniem IL-6 w obecności badanego związku o stężeniach 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM.
- 2) Wyniki badań sugerują, że kwas fitynowy może modulować funkcje immunologiczne komórek nowotworowych jelita grubego poprzez oddziaływanie na sekrecję IL-6.

PIŚMIENNICTWO

1. Wcisło G., Szenajch J., Bodnar L. i wsp. Rak jelita grubego w świetle współczesnych badań molekularnych. *Współcz. Onkol.* 2006; 10: 103-110.
2. Kamińska J., Kowalska M., Kotowicz B., Fukasiewicz M. Cytokiny jako niezależne czynniki prognostyczne u chorych na nowotwory złośliwe. *Współcz. Onkol.* 2006; 10: 259-262.
3. Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitowski M. Znaczenie kliniczne interleukiny-6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007; 117: 247-251.
4. Ziółko E., Zych R., Bucior J. Biologiczne zależności między interleukiną-6 a szpiczakiem mnogim i ich następstwa kliniczne. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2004; 58: 194-203.
5. Augustyniak D., Majkowska-Skrobek G., Basiewicz-Worsztynowicz B., Jankowski A. Rola kompleksu IL-6/sIL-6R oraz jego naturalnego inhibitora sgp130 w modulowaniu procesu zapalnego. *Post. Biochem.* 2006; 52: 194-203.
6. Hong D.S., Angelo L.S., Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer* 2007; 110: 1911-1928.
7. Somers W., Stahl M., Seehra J.S. A crystal structure of interleukin-6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* 1997; 16: 989-007.
8. Klimiuk P.A., Sierakowski S., Gińdzieńska-Sieśkiewicz E., Chwiećko J. Przydatność oznaczania w surowicy krwi stężeń interleukiny-6 (IL-6), metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów w ocenie aktywności reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2005; 43: 239-242.
9. Becker C., Fantini M.C., Wirtz S. i wsp. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 217-220.

10. Salgado R., Junius S., Benoy I. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 103: 642-646.
11. Esfandi F., Mahammadzadeh Ghobadloo S., Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2006; 244: 76-78.
12. Vucenik I., Shamshuddin A. M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr. Cancer* 2006; 55: 109-125.
13. Shamsuddin A.M. Inositol phosphates have a novel anticancer function. *J. Nutr.* 1995; 125: 725S-732S.
14. Vucenik I., Shamsuddin A.M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J. Nutr.* 2003; 133: 3778S-3784S.
15. Węglarz L., Molin I., Orchel A., Parfiniewicz B Dzierżewicz Z. Quantitative analysis of the level of p53 and p21^{WAF1} mRNA in human colon cancer HT-29 cells treated with inositol hexaphosphate. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53: 349-356.
16. Węglarz L., Parfiniewicz B., Dzierżewicz Z., Wilczok T. Kwas fiynowy jako potencjany czynnik przeciwnowotworowy jelita grubego. *Gastroenterol. Pol.* 2003; 10: 441-448.
17. Fox CH., Eberl M. Phytic acid (IP6) novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complement. Ther. Med.* 2002; 10:220-234.
18. Eggleton P. Effect of IP6 on human neutrophil cytokine production and cell morphology. *Anticancer Res* 1999; 19: 3711-3715.
19. Shirota K., LeDuy L., Yuan S.Y., Jothy S. Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. *Virchows Arch. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1990; 58: 303-308.
20. Brozek W., Bises G., Fabjani G., Cross H. S., Peterlik M. Clone-specific expression, transcriptional regulation, and action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells. *BMC Cancer* 2008; 8: 8-16.
21. Legrand-Poels S., Schoonbroodt S., Piette J. Regulation of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines in a colon cancer cell line. *Biochem. J.* 2000; 349: 765-773.
22. Jung H. C., Eckmann L., Yang S. K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wróblewska E. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 55-65.
23. Węglarz L., Wawszczyk J., Orchel A., Jaworska-Kik M., Dzierżewicz Z. Phytic acid modulates in vitro IL-8 and IL-6 release from colonic epithelial cells stimulated with LPS and IL-1. *Dig. Dis. Sci.* 2007; 52: 93-102.
24. Ullah A., Shamsuddin A. M., Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F 344 rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 2219-2222.
25. Verghese M., Rao D. R., Chawan L. T., Walker L. T., Shackelford L. Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): apoptosis as a possible mechanism of action. *LWT – Food Sci. Tech.* 2006; 39: 1093-1098.
26. Węglarz L., Parfiniewicz B., Orchel A., Wawszczyk J., Kierot J. Antiproliferative and apoptotic effects of inositol hexaphosphate on human colon cancer Caco-2 cells. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2007; 61: 477-484.
27. Zhang Z., Song Y., Wang X. Inositol hexaphosphate – induced enhancement of natural killer cell activity correlates with suppression of colon carcinogenesis in rats. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 5044-5046.