

ŹRÓDŁA POKARMOWE ORAZ EFEKTY PROZDROWOTNE SPRZĘŻONYCH DIENÓW KWASU LINOŁOWEGO (CLA)

Agnieszka Białek*, Andrzej Tokarz

Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Katedra i Zakład Bromatologii, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* Autorka korespondująca, tel. 22 5720785, e-mail: agnieszka.bialek@wum.edu.pl

Otrzymany 24.11.2008; zaakceptowany 8.12.2008; zamieszczony 29.01.2009

STRESZCZENIE

Tłuszcz mleczny jest jednym z najbardziej złożonych tłuszczów naturalnych. Zawiera on ponad 400 różnych kwasów tłuszczowych, z których większość (>98%) związana jest w postaci triacylogliceroli. Stanowi on główne pokarmowe źródło sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA - Conjugated Linoleic Acid). Nazwa ta obejmuje grupę pozycyjnych i geometrycznych izomerów kwasu linolowego, których cechą charakterystyczną jest obecność w cząsteczce sprzężonego układu wiązań podwójnych. Kwas żwaczowy (kwas *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowy) jest podstawowym izomerem CLA występującym w tłuszczu mlecznym zwierząt poligastrycznych, gdzie stanowi on 80-90% całkowitej zawartości CLA. Na podstawie licznych publikacji wydaje się, że w komponowaniu racjonalnej diety należy zwrócić uwagę na podaż sprzężonych dienów kwasu linolowego, które wykazują wiele działań prozdrowotnych, m.in.: przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe. Podstawowe źródło tych związków w diecie stanowi mleko i produkty mleczarskie. W niniejszej pracy dokonano przeglądu doniesień na temat działania CLA na stan zdrowia. Zaprezentowano także wyniki oznaczeń zawartości tych związków w popularnych produktach mleczarskich.

SŁOWA KLUCZOWE: sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), produkty mleczarskie, miażdżyca, nowotwory

ABSTRACT

DIETARY SOURCES AND BENEFICIAL HEALTH EFFECTS OF CONJUGATED LINOLEIC ACIDS (CLA)

Dairy fat is one of the most complex of natural fats. It contains over 400 different fatty acids, most of them (>98%) as triglycerides, and is the main dietary source of conjugated linoleic acids (CLA). CLA is a group of positional and geometric isomers of linoleic acid containing a conjugated double bond system. Rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid) is the predominant CLA isomer that accounts for 80-90% of the total CLA amount in dairy fat of poligastric animals. Multiple publications suggest that rational dietetics should assure an adequate supply of CLA, which have many beneficial health effects, including prevention of cancer and diabetes, and antiinflammatory and antiatherogenic properties. Milk and dairy products are the main dietary source of CLA. This review focuses on the health effects of conjugated linoleic acid and also summarizes the CLA content of common dairy products.

KEYWORDS: conjugated linoleic acid (CLA), dairy products, atherogenesis, tumours

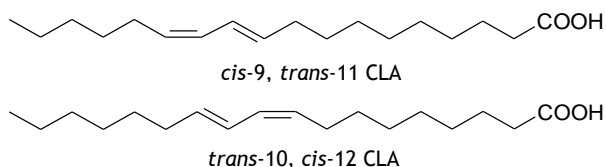
I. Efekty metaboliczne CLA

Wprowadzenie

Hiperlipidemia, otyłość, osteoporoza, cukrzyca, nowotwory stanowią najpoważniejsze problemy zdrowotne nękające starzejące się społeczeństwa rozwiniętych gospodarczo i cywilizacyjnie krajów. Niezaprzeczalnie są one związane z niekorzystnymi zmianami, jakie zaszły na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci w stylu życia i sposobie odżywiania populacji. Miażdżyca wraz z jej powikłaniami, przede wszystkim zawałem mięśnia sercowego, należą do głównych przyczyn większości zgonów notowanych w wielu krajach. Sam proces rozwoju arteriosklerozy polega na powstawaniu złogów lipidowych w błonie wewnętrznej naczyń tętniczych. Towarzyszy temu odkładanie się kolagenu, soli wapnia i proteoglikanów oraz mnożenie komórek mięśni gładkich i uszkodzenia włókien sprężystych. Następstwem tych zmian jest zwężenie światła tętnic, co prowa-

dzi do niedokrwienia tkanek, a dalej do takich schorzeń jak: choroba niedokrwienna serca, zawał, chromanie prze-stankowe czy zmiany otępienne. Wiele czynników środowiskowych, jak palenie tytoniu, mała aktywność fizyczna, otyłość - zwłaszcza typu androidalnego oraz nieracjonalne żywienie, wyraźnie oddziałują na przebieg i intensywność procesów rozwoju miażdżycy. Szczególnie istotną rolę promiażdżycową przypisuje się podaży w diecie nasyconych kwasów tłuszczowych, których głównymi źródłami są tłuszcze zwierzęce. Zmniejszenie ich spożycia na rzecz tłuszczów roślinnych istotnie wpływa na spadek umieralności z powodu choroby wieńcowej, co obserwowano m.in. w Finlandii, Norwegii, Kanadzie [1]. Z drugiej jednak strony badania nad rolą czynników dietetycznych w dynamice procesów arteriosklerozy od lat kierują uwagę badaczy ku grupie kwasów tłuszczowych pochodzenia zwierzęcego, dla których wykazano wiele interesujących, a zarazem

zaskakujących działań prozdrowotnych. Są nimi sprzężone dieny kwasu linolowego, nazywane w skrócie CLA od angielskiej nazwy „Conjugated Linoleic Acid”. Termin ten określa grupę izomerów pozycyjnych i stereoisomerów kwasu linolowego (*cis*-9, *cis*-12 oktadekadienowego), które posiadają w swej cząsteczce układ wiązań sprzężonych. W ich łańcuchach węglowych wiązania podwójne rozdziela - inaczej niż w kwasie linolowym, nie grupa metylenowa, a jedno wiązanie pojedyncze. (Ryc. 1).



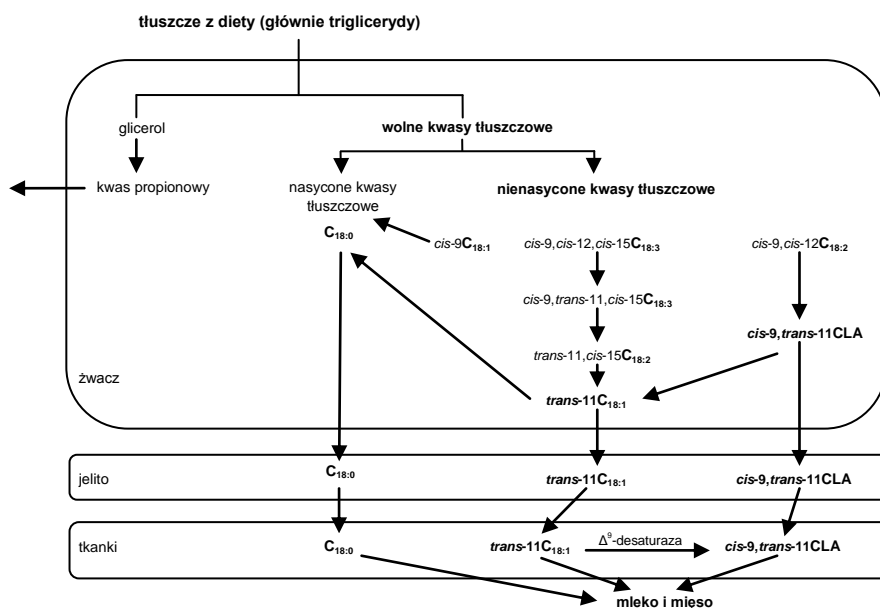
Ryc. 1. Struktura podstawowych izomerów kwasu linolowego z układem wiązań sprzężonych o stwierdzonej aktywności biologicznej: kwasu *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego i kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowego.

Głównymi naturalnymi źródłami tych związków są produkty mleczne i mięso pochodzące od zwierząt poligastycznych. Choć istnieje potencjalnie 28 różnych izomerów CLA, jednak w największych ilościach w tłuszczu przeżuwaczy obecny jest kwas *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowy, nazywany także „kwasem żwaczowym” (ang. ruminic acid), która to nazwa wzięła swój początek od jednego z miejsc powstawania tego związku w organizmie zwierzęcia. Część puli kwasu *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego powstaje właśnie w żwaczu jako produkt pośredni podczas wieloetapowego biouwodornienia kwasu linolowego do kwasu stearynowego. Proces ten zachodzi na skutek działania licznych enzymów bakterii symbiotycznych zasiedlających przewód pokarmowy, głównie *Butyrivibrio fibrisolvens*. Natomiast głównym miejscem syntezy kwasu żwaczowego są tkanki zwierząt poligastycznych, gdzie enzym Δ^9 -desaturaza przekształca kwas *trans*-11 oktadeke-

nowy (kwas wakcenyowy) do kwasu żwaczowego, wprowadzając w pozycję 9 wiązanie nienasycone o konfiguracji *cis* (Ryc. 2).

Zawartość izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA w mleku krowim waha się od 2,9 do 11,3 mg/g tłuszczu, co stanowi 73 - 93% całkowitej puli CLA [2]. Podobne przemiany kwasu wakcenyowego do kwasu żwaczowego mają miejsce w organizmach ludzkich, dzięki aktywności obecnej w nich Δ^9 -desaturazy [3], jednak np. tylko ok. 10% kwasu *cis*-9, *trans*-11 CLA obecnego w mleku kobiecym powstaje na drodze endogennej syntezy, podczas gdy u krów pula ta stanowi aż 80% [4]. Drugi z izomerów CLA o stwierdzonej aktywności biologicznej - kwas *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowy, powstaje u przeżuwaczy również na drodze przemian kwasu linolowego w wyniku działania enzymów bakteryjnych. Jednak z powodu braku w organizmach ssaków enzymu Δ^{12} -desaturazy, nie jest możliwe jego powstawanie z kwasu *trans*-10 oktadekadienowego w tkankach, na drodze analogicznej, prowadzącej do powstawania izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA z kwasu wakcenyowego. Tak więc cała jego pula obecna w tkankach zwierzęcych pochodzi z syntezy tkankowej i bakteryjnej w układzie pokarmowym. Podobny model nie może być skopiowany w warunkach organizmu ludzkiego [5].

Zainteresowanie tą grupą związków zostało zapoczątkowane zaskakującymi wynikami badań prowadzonych przez Michaela Pariza i wsp., na przełomie lat 70 i 80 XX wieku. Wykazali oni, że w mięsie wołowym, zarówno poddanym jak i niepoddanym obróbce termicznej, oprócz spodziewanych mutagenów, obecne są także czynniki hamujące mutagenezę u bakterii *Salmonella tiphimurium* [6]. Dalsze badania wykazały, że czynniki te mogą również hamować karcinogenezę wywołowaną chemicznie za pomocą 7,12-dimetylobenz[a]antracenu, oraz że za to działanie odpowiadają CLA [7].



Ryc. 2. Szlaki powstawania kwasu żwaczowego w organizmach przeżuwaczy (wg Tanaki [45]).

Ta grupa kwasów tłuszczowych wydaje się być efektywna w hamowaniu kancerogenezy w różnych systemach (np. rak piersi, skóry, okrężnicy) i na różnych etapach procesu (m.in. inicjacji, promocji, progresji i metastazy). Wykazano to w wielu badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych, m.in. w modelu szczurzym raka sutka wykazano, że CLA hamuje proliferację komórek epitelialnych, indukuje apoptozę oraz hamuje angiogenezę. Masso - Welch i wsp. [8] wykazali, że najczęściej występujące izomery CLA tj. *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12 (Ryc. 1) są odpowiedzialne za hamowanie angiogenezy. Wyniki badań sugerują, że kluczowe znaczenie w powstawaniu raka piersi ma dieta w wieku młodzieńczym [9,10]. Dodatkowo hipotezę tę potwierdzają badania Thompsona i wsp. [11], którzy wykazali znaczenie spożycia CLA przed i w okresie dojrzewania w hamowaniu kancerogenezy raka sutka indukowanej chemicznie np. za pomocą 7,12-dimetylobenz(a)antracenu czy N-nitrozo-N-metylomocznika.

Wyniki badań prowadzonych nad właściwościami antykancerogennymi CLA spowodowały, że National Academy of Sciences of USA zaakceptowała CLA jako jedyny kwas tłuszczowy, wykazujący niedwuznacznie zdolność hamowania karcinogenezy u zwierząt [12].

Stwierdzenie to pociągnęło za sobą kolejne liczne badania, które w konsekwencji doprowadziły do poszerzenia wiedzy o tej grupie związków i ich właściwościach prozdrowotnych, m.in. przeciwnowotworowych, przeciw cukrzycowych, przeciwzapalnych czy przeciw miażdżycowych. Korzystny wpływ na stan zdrowia przypisywany jest głównie dwóm izomerom CLA: *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12.

Dzięki poznaniu szlaków metabolicznych lipidów w ustroju zaistniała możliwość oddziaływania farmakologicznego na te przemiany w celu poprawy poziomów poszczególnych frakcji lipidowych we krwi. Nadal jednak podstawowe znaczenie hipolipidemizujące ma odpowiednia dieta oraz kontrola masy ciała. Stosując racjonalne postępowanie dietetyczne można uzyskać obniżenie stężenia cholesterolu we krwi nawet o 15%. W komponowaniu takiej diety należy zwrócić uwagę na podaż sprzężonych dienów kwasu linolowego.

Badanie właściwości przeciw miażdżycowych CLA na modelach zwierzęcych

1. Myszy

Myszy C57BL/6 są jedną z grup zwierząt stosowanych jako organizmy modelowe w pracach nad dynamiką procesów prowadzących do rozwoju arteriosklerozy, gdyż przy karmieniu ich dietą bogatą w tłuszcze bardzo szybko, bo już w przeciągu 15 tygodni pojawiają się u nich w zatokach aorty pasma tłuszczowe. W badaniach Munday'a i wsp. [13] z użyciem tych zwierząt suplementowano ich dietę mieszaniną izomerów CLA w ilościach 2,5 g CLA/kg i 5,0 g CLA/kg właśnie przez 15 tygodni. Nie spowodowało to znaczących różnic w stężeniu cholesterolu całkowitego (TC) i HDL (lipoprotein o dużej gęstości), obniżyło jednak stężenie triglicerydów. Zaobserwowano ponadto w grupach z dodatkiem CLA znaczący wzrost wskaźnika [HDL:cholesterol całkowity], co jest objawem pozytywnym, gdyż w stosowanym modelu rozwój miażdżycy wykazuje wyraźną odwrotną korelację z powyższym wskaźnikiem. Pomimo to obszar i ilości pasm tłuszczowych w zatokach aortalnych w grupie

zwierząt otrzymujących CLA były większe niż w grupie kontrolnej, co może zdaniem autorów wskazywać, że mechanizm działania CLA powodujący powstawanie złogów tłuszczowych nie jest związany z profilem lipoproteinowym, ani z poziomami triglicerydów w osoczu.

Podobne rezultaty otrzymał Nestel i wsp. [14] podając myszom apoE knockout z rozwiniętą cukrzycą kwas żwaczowy w ilości 0,9% normalnej diety. Podobnie jak Munday [13] nie zaobserwował zmian w stężeniach cholesterolu całkowitego (zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej), wykazał jednak wyraźne obniżenie stężenia triglicerydów w grupie badanej. Stwierdził ponadto, zarówno w grupie zwierząt zdrowych jak i ze zdiagnozowaną cukrzycą, zwiększenie stężenia frakcji HDL o ok. 50% pod wpływem suplementacji CLA, co może być wynikiem albo zmiany procesów wymiany lipidów pomiędzy klasami lipoprotein, albo zwiększonego katabolizmu lipoprotein bogatych w triglicerydy. Pomimo dodatku *cis*-9, *trans*-11 CLA do diety w ilości 0,9% nie wykazał on jednak zahamowania rozwoju zmian miażdżycowych w łuku aorty [14]. Natomiast wzbogacenie diety proaterogennej myszy ApoE^{-/-} w mieszaninę izomerów *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12 (80:20) w ilości 1% spowodowało nie tylko zahamowanie procesów miażdżycowych, ale doprowadziło nawet do cofnięcia w 90% już zaistniałych wczesnych zmian aortalnych [15]. Badając mechanizm tych zmian autorzy wykazali, że suplementacja CLA zasadniczo powiększała i tak już pobudzoną ekspresję PPAR γ (receptorów aktywowanych proliferatorami peroksy-somów typu γ), a także wyraźnie indukowała w aorcie ekspresję PPAR α . Substancje farmakologiczne, będące agonistami receptorów PPAR α i PPAR γ , jak fibraty, hamują rozwój miażdżycy i w niektórych przypadkach powodują nawet odwrócenie już zaistniałych niekorzystnych zmian w naczyniach. Spostrzeżenia na temat działania na receptory PPAR były zbieżne z zaobserwowaną także zmniejszoną kumulacją makrofagów, obniżoną ekspresją czynników wpływających na adhezję i migrację monocytów w ścianach naczyń, oraz pobudzoną apoptozą makrofagów w miejscach zmian miażdżycowych.

Arbonés-Mainar i wsp. [16] wykorzystali podobny model badawczy do zbadania wpływu izomerów CLA, podawanych osobno, na procesy arteriosklerozy. Wykazali, że kwas *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowy, mimo iż powoduje znacznie mniejszy przyrost masy ciała zwierzęcia, zdecydowanie niekorzystnie wpływa na wiele wskaźników przemian metabolicznych tłuszczów powodując m.in. wzrost stężenia cholesterolu całkowitego, triglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych oraz prowadzi do hiperглиkemii, podczas gdy kwas *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowy wykazuje działanie przeciwne obniżając wartości wymienionych parametrów. O wyraźnych właściwościach proaterogennych izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA świadczy także, zdaniem autorów, fakt występowania zdecydowanie większego obszaru uszkodzeń miażdżycowych w aorcie w grupie zwierząt, których dieta była nim suplementowana w ilości 1%, niż w grupach kontrolnej i z dietą suplementowaną kwasem żwaczowym. W tej ostatniej grupie ilość zmian miażdżycowych była niewielka, mniejsza nawet niż w kontrolnej. Dodatkowo w grupach kontrolnej i z udziałem kwasu żwaczowego powstająca płytka miażdżycowa była stabilniejsza, co obniżało ryzyko jej oderwania i zamknięcia światła naczynia. Stwierdzono, na podstawie uzyskanych

wyników, że izomery *cis*-9, *trans*-11 CLA i *trans*-10, *cis*-12 CLA mogą różnie wpływać na procesy rozwoju płytki miażdżycowej i jej stabilność. W kontekście oddziaływania na arteriosklerozę należałoby więc, zdaniem autorów, rozpatrywać CLA jako bardziej heterogenną grupę związków, o możliwych różnych działaniach biologicznych i wskazaniach do stosowania jako suplementy diety.

2. Króliki

Kolejnymi zwierzętami stosowanymi jako organizmy modelowe w badaniach wpływu różnorodnych czynników na rozwój miażdżycy naczyń są króliki. Kritchevsky i wsp. [17] stwierdzili, że króliki, u których stosowano dietę bogatą cholesterolową wzbogaconą mieszaniną izomerów CLA w różnych ilościach, charakteryzowały się znacznym ograniczeniem procesów i zmian miażdżycowych. Już 0,1% udział CLA w diecie powodował zahamowanie tych procesów aż w 34%, zaś 1,0% dodatek mieszaniny izomerów CLA do diety powodował znaczne, bo aż 30% cofnięcie zaistniałych wcześniej uszkodzeń naczyń. Interesującym wydaje się fakt, że również w tym przypadku w badanych grupach nie wykazano istnienia znaczących powiązań pomiędzy notowanymi poziomami frakcji lipidowych, a obserwowanym wpływem na przebieg procesów miażdżycowych. Grupy karmione dietą z dodatkiem CLA wykazywały porównywalne lub nieco wyższe stężenia cholesterolu całkowitego i triglicerydów w osoczu. W późniejszych badaniach [18] wykazano, że nawet zdecydowanie niższe poziomy CLA w diecie mogą wykazywać działanie przeciwmiażdżycowe. Dodając CLA do diety aterogennej w różnych stężeniach zaobserwowali, że każdy dodatek CLA - niezależnie od dawki - powodował wzrost poziomów triglicerydów w osoczu, zaś stężenia rzędu 0,075% - 0,05% CLA w diecie znacznie zwiększały poziom frakcji HDL. Już tak niewielki dodatek CLA do diety, jak 0,05% powodował w pewnym stopniu zahamowanie procesów miażdżycowych, o czym świadczyło zmniejszenie ilości patologicznych zmian w tętnicy piersiowej grupy badanej, zaś udział CLA w diecie na poziomie 0,10% niwelował zmiany sklerotyczne w łuku aorty o 40%. Autorzy stwierdzili, że efekt przeciwmiażdżycowy rośnie wraz ze zwiększaniem się udziału CLA w diecie. Co więcej, stwierdzono, że poziomy CLA, zasugerowane przez nich jako efektywne w zapobieganiu miażdżycy, mogą być uzyskiwane niejako naturalnie bez szczególnie drastycznych modyfikacji diety. Kontynuując badania [19] stwierdzono także brak występowania istotnych różnic w efektywności działania mieszaniny i pojedynczych izomerów CLA (62% dla mieszaniny, 48% dla izomeru *cis*-9, *trans*-11 i 55% dla izomeru *trans*-10, *cis*-12). Wykazano występowanie efektu hamowania zmian miażdżycowych w 60% i cofanie już zaistniałych uszkodzeń w 35 - 45%. Nie wykazali oni ponadto istotnych statystycznie różnic w poziomach cholesterolu całkowitego, triglicerydów i innych frakcji lipidowych, choć w grupach spożywających kwas żwaczowy notowano najniższe stężenia triglicerydów w osoczu.

3. Szczury

Występowanie nadciśnienia tętniczego jest wyraźnie związane z ryzykiem miażdżycy naczyń. Wpływ sprzężonych dienów kwasu linolowego na rozwój tego stanu patologicznego badano m.in. z wykorzystaniem szczurów jako

zwierząt modelowych. U otyłych szczurów OFLETF [20], u których dodatkowo występowała cukrzyca, a także stwierdzono hiperlipidemię i nadciśnienie, zastosowano suplementację diety 0,5% dodatkiem kwasu żwaczowego lub 0,5% dodatkiem kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowego w porównaniu do grupy kontrolnej, której dietę wzbogacono 0,5% dodatkiem oleju bogatego w kwas linolowy. Po trzytygodniowym okresie karmienia zmodyfikowaną dietą obserwowano, w grupie otrzymującej izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA, znacznie mniejszy wzrost ciśnienia tętniczego krwi, niż w pozostałych grupach, co zdaniem autorów może świadczyć o hamowaniu przez ten izomer rozwoju nadciśnienia. Nie wpływał on jednak na aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE). Ponadto już po tak krótkim okresie stwierdzono w grupie z udziałem *trans*-10, *cis*-12 znaczny spadek masy tkanki tłuszczowej (co wydaje się być objawem bardzo korzystnym), oraz obniżenie poziomu sekrecji cytokin hipertensyjnych, co może być jednym z potencjalnych mechanizmów działania hipotensyjnego. Podobnie podawanie przez Inoue i wsp. [21] nieotyłym szczurom, ze spontanicznym nadciśnieniem, diety wzbogaconej przez dodatek CLA w ilości 1%, wywoływało znacznie mniejszy wzrost ciśnienia tętniczego, w porównaniu do grupy kontrolnej. Autorzy stwierdzili, że efekt ten jest wynikiem zwiększonego stężenia adiponektyny w osoczu. CLA przez pobudzenie receptorów PPAR γ prowadzi do aktywacji promotora genu adiponektyny i dalej do zwiększonej ekspresji mRNA adiponektyny, czego efektem są jej wyższe poziomy notowane w badaniu.

4. Chomiki

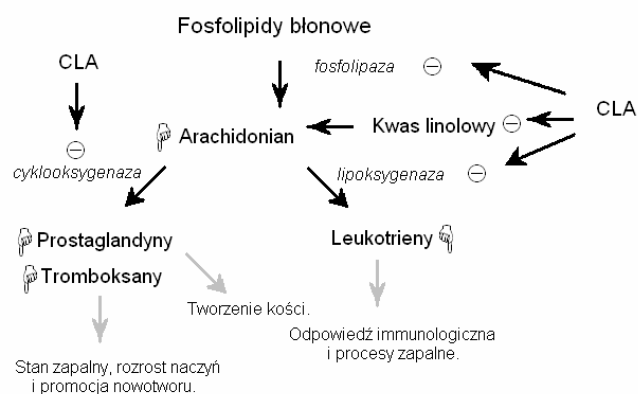
Chomiki są kolejnym przykładem organizmów stosowanych jako modele badawcze dla określenia wpływu kwasów tłuszczowych na gospodarkę cholesterolową w ustroju i rozwój arteriosklerozy. Badania Deckere'a i wsp. [22] prowadzone właśnie z wykorzystaniem chomików miały na celu określenie wpływu suplementacji diety zarówno mieszaniną, jak i pojedynczymi izomerami CLA na profil lipidowy osocza i skład lipidów tkanek, oraz oddziaływania CLA na proliferację peroksyosomów. Podobnie jak w przypadku cytowanych uprzednio badań innych grup badawczych [16, 20] stwierdzili oni, że izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA był efektywniejszy w hamowaniu przyrostu masy ciała niż kwas żwaczowy. Co więcej, to on wyraźniej wpływał na zawartość i skład poszczególnych frakcji tłuszczowych. Wywoływał on m.in. wzrost stężenia VLDL (lipoprotein o bardzo małej gęstości) i triglicerydów, obniżał zaś stężenie cholesterolu całkowitego, LDL (lipoprotein o małej gęstości) i HDL, a także zwiększał udział triglicerydów w VLDL, HDL i LDL. Wykazali oni ponadto, że izomer ten stymuluje utlenianie osiemnastowęglowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie przez autorów hipotezy o wyraźnym działaniu biologicznym kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowego i braku takiego działania w przypadku kwasu *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego w kontekście ich wpływu na szlaki metaboliczne lipidów [22]. Gavino i wsp. [23] również potwierdzili nierównocennność izomerów CLA wykazując, że mieszanina izomerów jest efektywniejszym czynnikiem ograniczającym przyrost masy tłuszczu w organizmie oraz silniej wpływa na metabolizm lipidów powodując spadek stężenia triglicerydów i cholesterolu całkowitego,

bez wyraźnego wpływu na poziomy HDL, niż sam kwas żwaczowy. Podobnie badania Navarro i wsp. [24] potwierdziły różną aktywność poszczególnych izomerów CLA. Zaobserwowali oni obniżanie się pod wpływem izomeru *trans*-10, *cis*-12 stężenia cholesterolu całkowitego i LDL w osoczu, podobnie jak Deckere i wsp. [22], oraz brak jego wpływu na poziomy triglicerydów, HDL i VLDL (inaczej niż Deckere i wsp. [22]), co pozwoliło im wskazać na kwas *trans*-10, *cis*-12 CLA jako czynnik aktywny w przeciwdziałaniu otyłości i o działaniu hipocholesterolemizującym.

Jednak do zupełnie przeciwnych wniosków doszli Valeille i wsp. [25], którzy stwierdzili na podstawie wyników badań prowadzonych, podobnie jak poprzednie grupy, na chomikach, że za działanie przeciwmiażdżycowe CLA odpowiada kwas żwaczowy. Podawany zarówno sam, jak i w mieszaninie izomerów zawierającej jego równoważną ilość, powodował wyraźny wzrost stężenia frakcji HDL oraz stosunku HDL:LDL, który jest miernikiem działania ochronnego w procesach arteriosklerozy. Co więcej stwierdzili oni, że CLA konkuruje z kwasami n-3 obecnymi w olejach rybnych na poziomie jądrowych czynników transkrypcyjnych, jak PPAR. Dodatek oleju rybnego do diety wzbogaconej w CLA niweluje działanie tego ostatniego.

Biorąc pod uwagę fakt, że głównym naturalnym źródłem CLA w diecie jest mleko i produkty mleczne, w tym masło, Lock i wsp. [26] zastosowali w diecie chomików, zawierającej 20% tłuszczu, masło wzbogacone w kwas wakcenowy i kwas żwaczowy odpowiednio w ilości 15,38 g/100g i 3,61 g/100g, oraz masło zawierające kwas wakcenowy w ilości 4,53 g/100g (dzięki użyciu częściowo uwodornionego oleju roślinnego). Przeprowadzone modyfikacje diety w grupach badanych zmieniły profil lipidowy osocza prowadząc w stosunku do grupy kontrolnej m.in. do spadku stężenia cholesterolu całkowitego, chylomikronów, LDL i IDL (lipoprotein o pośredniej gęstości) w obydwu grupach badanych. Ponadto w grupie spożywającej masło wzbogacone zarówno w kwas wakcenowy jak i żwaczowy notowano niższe stężenia VLDL w osoczu. Mimo, że oznaczane poziomy HDL nie uległy istotnym zmianom, to jednak stosunek sumy potencjalnie aterogennych lipoprotein VLDL, LDL i IDL do przeciwmiażdżycowych HDL uległ znaczącej redukcji w grupie przyjmującej w dużych ilościach zarówno kwas wakcenowy jak i żwaczowy, w stosunku zarówno do grupy kontrolnej, jak i do grupy z wprowadzonym do diety modyfikowanym olejem roślinnym. Wzbogacanie diety wpływało także na skład ilościowy lipidów tkanek, prowadząc w obydwu grupach badanych do zwiększenia zawartości kwasu żwaczowego i kwasu wakcenowego w wątrobie i tkance tłuszczowej, a także do zwiększenia w nich zawartości sumy izomerów *trans* C18:1, co odzwierciedlało skład spożywanego pożywienia. Uzyskane zmiany w strukturze ilościowej lipidów osocza pozwoliły autorom pozytywnie ocenić wpływ większej podaży w diecie kwasów żwaczowego i wakcenowego na ryzyko wystąpienia i rozwoju miażdżycy. Także lepsza przyswajalność kwasu *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowego w postaci triglicerydów, w jakiej to formie występuje on m.in. w maśle, wskazuje na potrzebę i słuszność prowadzenia dalszych badań nad produktami bogatymi w kwas żwaczowy i wakcenowy jako „żywnością funkcjonalną” o korzystnym prozdrowotnym wpływie na organizm. Kolejne badania Valeille i wsp. [27] również dowiodły, że spożywa-

nie tłuszczu mlecznego o dużej zawartości kwasu żwaczowego może hamować procesy arteriosklerozy. W zastosowanym modelu badawczym uzyskali oni obniżenie zawartości cholesterolu w tkankach aorty, poprawę transportu cholesterolu we krwi oraz działanie ochronne przed zmianami oksydacyjnymi na LDL, dzięki zwiększeniu aktywności paraoksonazy. Potwierdzili także, że rejestrowane przeciwmiażdżycowe efekty działania izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA są częściowo rezultatem wpływu na ekspresję licznych genów, gdyż powoduje on m.in. aktywację przeciwzapalnej kaskady sygnałowej PPAR/LXR (wątrobowy receptor typu X), nadekspresję czynników transkrypcyjnych blokujących zapalne geny clusterowe kodujące IL-18 (interleukinę 1), COX-2 (cyklooksygenazę 2), TNF- α (czynnik martwicy nowotworów), oraz zwiększenie o 30% ekspresji podrodziny A1 kasety wiążącej ATP w aorcie. Wszystkie te spostrzeżenia potwierdzają, zdaniem autorów, korzystny wpływ długotrwałego spożywania kwasu żwaczowego z dietą na stan zdrowia człowieka. Dalsze prace Valeille i wsp. [28] potwierdziły istotne znaczenie podaży w diecie kwasu żwaczowego w postaci naturalnych źródeł, jak np. tłuszcz mleczny. Wykazali oni, że tłuszcz mleczny pochodzący od zwierząt wypasanych na łąkach, tj. bogaty w kwas *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowy, jest mniej miażdżycorodny od tłuszczu mlecznego pochodzącego od zwierząt oborowanych. *Cis*-9, *trans*-11 CLA i kwas wakcenowy obecne są w nim w formie glicerydowej, przez co są łatwiej przyswajane przez organizm i dlatego mogą powodować wiele pozytywnych następstw. Wyraźnie oddziaływały one na profil lipidowy osocza zmniejszając stężenie frakcji LDL, powodując wzrost zawartości frakcji HDL, obniżając stosunek LDL:HDL, a także redukowały wskaźnik podatności LDL na zmiany oksydacyjne. Ich wpływ na organizm zaznaczał się także na poziomie genów, gdyż obserwowano hamowanie procesów zapalnych (Ryc. 3), dzięki redukcji ekspresji genów IL-18 i COX-2. Co więcej, powodowały one także zmniejszone gromadzenie monocytów w ścianach tętnic. W konsekwencji wszystkie te zmiany mogą hamować dynamikę procesów powstawania i rozwoju arteriosklerozy, stąd zwiększona zawartość kwasu żwaczowego w tłuszczu mlecznym znacząco przyczynia się do redukcji, zdaniem autorów, potencjału promiażdżycowego, wynikającego z dużej zawartości w tym tłuszczu krótko- i średniołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych.



Ryc. 3. Działanie sprzężonych dienów kwasu linolowego na metabolizm kwasu linolowego (wg Tanaki [45]).

W przeprowadzonych przez Mitchell i wsp. [29] badaniach z zastosowaniem pojedynczych izomerów CLA, które w ilości 1% dodawano do diety chomików, bogatej w tłuszcz i cholesterol, również wykazano zdolność CLA do zmniejszania patologicznych zmian miażdżycowych w aorcie. Co więcej uzyskane przez nich wyniki wskazują, że kwasy *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienowy i *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowy mogą w porównywalnym stopniu redukować częstotliwość uszkodzania naczyń. Interesujące wydaje się być także niewystępowanie wielu istotnych statystycznie różnic w stężeniach frakcji lipidowych pomiędzy grupami badanymi, poza zwiększeniem stężenia HDL w grupie otrzymującej kwas *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowy. Zaobserwowano natomiast tendencję do spadku poziomu cholesterolu w grupie spożywającej dietę z dodatkiem kwasu żwaczowego i przeciwną tendencję w grupie, której pokarm wzbogacano izomerem *trans*-10, *cis*-12 CLA. Nie stwierdzono jednak żadnego związku pomiędzy hamowaniem powstawania płytki miażdżycowej, a profilem lipoproteinowym osocza, zaś jednoznaczne potwierdzenie pozytywnego wpływu CLA na procesy arteriosklerozy uzyskano porównując efekty ich działania z wpływem kwasu linolowego.

Wilson i wsp. [30] suplementując bogatocholesterolową dietę chomików pojedynczymi izomerami CLA lub kwasem linolowym w ilości 0,5%, obserwowali wpływ czasu ich stosowania na rejestrowane zmiany. Przy spożywaniu modyfikowanej diety przez okres 12 tygodni zauważono znacznie wyraźniejsze efekty działania suplementów, niż przy stosowaniu ich przez 8 tygodni. Po tym czasie u wszystkich grup odnotowano w osoczu niższe poziomy cholesterolu całkowitego i HDL. W grupach otrzymujących CLA również stężenia innych niż HDL lipoprotein były niższe, a grupa przyjmująca kwas żwaczowy dodatkowo odznaczała się niższymi poziomami triglicerydów i glukozy we krwi. U zwierząt tej grupy tkanki aorty zawierały także znacznie mniejsze ilości cholesterolu wolnego i estrów cholesterolu w porównaniu do grupy suplementowanej kwasem *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowym. Dodatkowo u chomików spożywających w diecie izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA obserwowano znaczący wzrost poziomu glukozy w zestawieniu z innymi grupami, co zdaniem autorów każe położyć zdecydowany nacisk na monitorowanie spożycia kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktadekadienowego przez pacjentów z cukrzycą typu drugiego. W swej pracy Navarro i wsp. [31] skupili się więc głównie na działaniu izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA, i stwierdzili brak wyraźnego działania hipocholesterolemicznego, pomimo hamowania procesów estryfikacji cholesterolu w wątrobie i obniżania stężenia małych VLDL w osoczu.

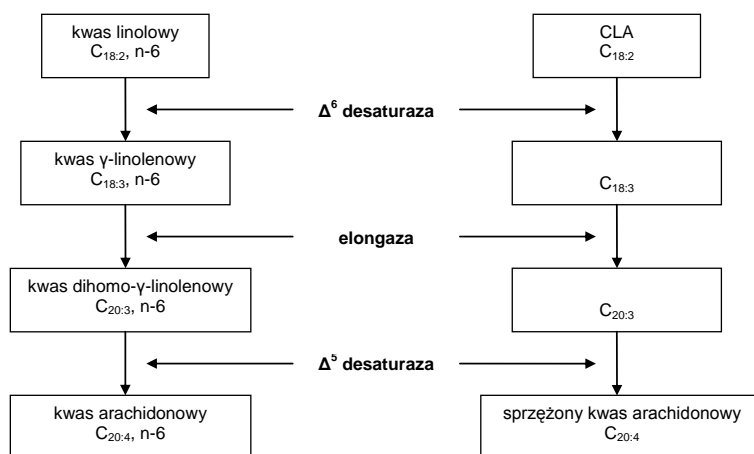
Zastosowanie tak różnorodnych modeli zwierzęcych w badaniach wpływu CLA na szeroko pojęte procesy miażdżycowe pozwoliło uzyskać wiele interesujących, często jednak wykluczających się wyników. Jest to główną przyczyną, dla której jednoznaczne wnioskowanie na ich podstawie na temat wpływu CLA na powstawanie i rozwój arteriosklerozy u ludzi jest niezwykle trudne. Obserwowane sprzeczności mogą częściowo wynikać z różnic w metabolizmie tłuszczów i sposobach regulacji ekspresji genów istniejących pomiędzy gatunkami [32]. Chomiki wydają się być najlepszym modelem badawczym dla określenia wpływu kwasów tłuszczowych na gospodarkę chole-

sterolową w ustroju człowieka, gdyż na wielu poziomach wykazują istotne podobieństwo do organizmów ludzkich. Zwierzęta te, podobnie jak ludzie, charakteryzują się dużą aktywnością transferazy estrów cholesterolowych w surowicy oraz znaczną zawartością LDL w osoczu. Regulacja receptora dla tych ostatnich, jak również synteza cholesterolu, kontrolowana jest podażą kwasów tłuszczowych w pożywieniu. Zarówno u ludzi, jak i u chomików poziom endogennej syntezy cholesterolu w wątrobie jest niski (u ludzi tylko ok. 10% całkowitej ilości syntezowanego cholesterolu pochodzi z wątroby [33]). Ponadto w obydwu gatunkach wątroba syntezuje lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), które zawierają jedynie apolipoproteinę B-100, a cholesterol pochodzący z diety nie aktywuje syntezy kwasów żółciowych [22]. Dzięki tym podobieństwom wydaje się, że wyniki uzyskane z zastosowaniem tego właśnie modelu badawczego, mogą mieć lepsze przełożenie na warunki organizmu ludzkiego.

Badanie działania przeciwmiażdżycowego CLA u ludzi

W porównaniu do dużej skali badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, dostępnych jest niewiele prac oceniających wpływ mieszaniny izomerów CLA na czynniki ryzyka arteriosklerozy u ludzi. Pomiędzy uzyskanymi wynikami istnieją wyraźne różnice.

Mougios i wsp. [34] suplementowali dietę młodych, zdrowych ochotników płci obojga podając równomolową mieszaninę izomerów *cis*-9, *trans*-11 CLA i *trans*-10, *cis*-12 CLA w postaci kapsułek, w ilości 0,7 g/dzień przez 4 tygodnie, a następnie 1,4 g/dzień przez kolejne 4 tygodnie. Zaobserwowali oni u wszystkich członków grupy badanej istotne zmniejszenie grubości fałdów skórnych i zawartości procentowej tkanki tłuszczowej w organizmie w drugim okresie suplementowania diety, tj. w okresie stosowania wyższych dawek CLA. Obserwując wpływ suplementacji sprzężonymi dniami kwasu linolowego na profil lipidowy osocza nie wykazali jednak żadnych wyraźnych zmian. Jedyną istotną statystycznie różnicą spośród zaobserwowanych było obniżenie stężenia frakcji HDL, zarówno w okresie niższego spożycia CLA, jak i po całym ośmiotygodniowym okresie suplementacji, co z punktu widzenia prewencji miażdżycy jest zmianą niekorzystną. Zauważono ponadto w pierwszym etapie badań tendencję do obniżania stężenia triglicerydów i poziomu cholesterolu całkowitego oraz wzrost stosunku cholesterolu całkowitego do HDL. Co więcej, zastosowana suplementacja zdecydowanie rzutowała na całkowitą zawartość CLA w lipidach osocza, podwajając ją po ośmiotygodniowym stosowaniu. Największy wzrost zawartości CLA wystąpił w triglicerydach. Ponadto zauważono, że podawanie CLA zdecydowanie obniżało stężenie kwasu arachidonowego we frakcji fosfolipidowej osocza, co może świadczyć o wpływie CLA na szlak przemian kwasu arachidonowego. W pracy Tricon i wsp. [35] opisano wpływ różnych dawek suplementów wzbogaconych w ściśle określony, pojedynczy izomer CLA, zarówno na profil lipidowy, jak i na wskaźniki insulinooporności i skład tkanek ciała u zdrowych ochotników. Kwas żwaczowy wykazywał znaczącą tendencję do obniżania poziomu cholesterolu całkowitego i LDL w osoczu, zaś nie obserwowano tego efektu dla izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA. Ponad-



Ryc. 4. Szlak metaboliczny kwasu linolowego i sprzężonych dienów kwasu linolowego (wg Tanaki [45]).

to stężenia triglicerydów oznaczone przy podawaniu izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA były zdecydowanie wyższe, niż po podawaniu kwasu żwaczowego. Wykazano także przeciwnie działanie tych izomerów na profil lipidowy osocza, gdyż izomer *cis*-9, *trans*-11 CLA zdecydowanie obniżał wskaźniki [LDL:HDL] i [cholesterol całkowity:HDL], zaś izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA miał działanie odwrotne. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźne hiperlipidemiczne właściwości kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktaidekadienowego oraz działanie hipolipidemiczne kwasu żwaczowego. Brak korelacji pomiędzy intensywnością mierzonego efektu, a stosowaną dawką pozwala ponadto przypuszczać, że działanie biologiczne CLA ujawnia się już przy niskich dawkach. Powyższe wyniki uzyskano bowiem podając kwas żwaczowy w ilości 0,59 g/dzień. Warto również zaznaczyć, że w tym badaniu suplementy CLA podawane były w postaci triglicerydów, a nie wolnych kwasów tłuszczowych, co mogło korzystnie wpływać na przyswajalność tych izomerów przez organizm. Autorzy doniesienia zalecają jednak daleko posuniętą ostrożność w stosowaniu suplementów CLA zawierających duże ilości izomeru *trans*-10, *cis*-12 CLA, oraz podkreślają konieczność dalszych badań nad mechanizmami działania CLA [35]. W kontynuacji badań [36] ta sama grupa badaczy podjęła się zbadania wpływu spożycia modyfikowanych produktów mlecznych, wzbogaconych niejako naturalnie (poprzez modyfikacje diety zwierząt) w kwas żwaczowy i kwas wakcenyowy na profil lipidowy, aterogenność LDL, proces zapalny i insulinooporność. Grupa badana spożywała przez okres 6 tygodni pełnotłuste mleko UHT, masło i ser wzbogacone we wspomniane wcześniej kwasy tłuszczowe, co zapewniało dzienną podaż kwasu żwaczowego na poziomie 1,421 g/dzień, a kwasu wakcenyowego 4,689 g/dzień. Nie stwierdzono znaczącego wpływu spożywania tak zmienionych produktów mlecznych na masę ciała, wysokość wskaźnika BMI, markery stanu zapalnego oraz insulinooporność. Co więcej nie wystąpiło również żadne znaczące oddziaływanie na poziomy triglicerydów, cholesterolu całkowitego, LDL, HDL i wolnych kwasów tłuszczowych. Wykazano natomiast, że spożycie tych modyfikowanych produktów mlecznych w sposób istotny statystycznie wpływało na zwiększenie stosunku LDL do HDL, jak również nieistotnie statystycznie zwiększało stosunek cholesterolu całkowitego do HDL w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie jednak spożycie produktów

wzbogaconych w kwas żwaczowy i kwas wakcenyowy nie zwiększało ilości małych gęstych LDL. Nie prowadziło również do nasilenia procesów oksydacyjnych, mimo że znacząco wzrosła zawartość tych kwasów w LDL. Poczynione obserwacje pozwoliły autorom doniesienia na sformułowanie wniosku o braku wyraźnego wpływu spożycia produktów mlecznych bogatych w CLA i kwas wakcenyowy na profil lipidowy osocza oraz o braku korelacji pomiędzy zwiększonym spożyciem takich produktów, a zwiększonym ryzykiem miażdżycy.

W badaniach Riséus i wsp. [37] grupę badaną stanowili mężczyźni z otyłością brzuszną, ze stwierdzonym zespołem metabolicznym, którzy otrzymywali mieszaninę izomerów lub izomer *trans*-10, *cis*-12 CLA w formie kapsułek żelatynowych. Uzyskane wyniki wskazują jedynie na niewielką redukcję ilości tkanki tłuszczowej, bez wpływu na masę ogólną i wskaźnik BMI, oraz na brak poprawy metabolizmu tłuszczów i glukozy. Co więcej, podobnie jak w badaniach Mougios i wsp. [34], stwierdzono niekorzystne działanie mieszaniny izomerów CLA, polegające na obniżeniu stężenia frakcji HDL. Przy stosowaniu suplementacji izolowanym izomerem *trans*-10, *cis*-12 CLA wyraźnemu pogorszeniu uległy wskaźniki biochemiczne - a mianowicie, oprócz spadku stężenia HDL, stwierdzono tendencję do stałego zwiększania zawartości triglicerydów w VLDL, jak i wzrost stężenia glukozy oraz zdecydowany spadek insulino-wrażliwości. Ze zwiększonym spożyciem CLA w diecie wiązało się ponadto nasilenie procesów nieenzymatycznej i enzymatycznej peroksydacji lipidów, czego wyrazem było zwiększone stężenie w moczu 8-izoprostaglandyny F_{2α} i jej głównego metabolitu. Uzyskane przez autorów wyniki każą, ich zdaniem, z dużą ostrożnością odnosić się do suplementowania diety CLA, zwłaszcza preparatami zawierającymi znaczne ilości kwasu *trans*-10, *cis*-12 oktaidekadienowego, przynajmniej do chwili jednoznacznego ustalenia mechanizmów działania poszczególnych izomerów CLA [37].

Wydaje się, że niezwykle interesującą grupą badaną, gdzie CLA może mieć istotne znaczenie zdrowotne, są pacjenci z cukrzycą typu drugiego. Badaniami [38] objęto więc taką grupę pacjentów, z glikemią kontrolowaną za pomocą diety, którym podawano mieszaninę izomerów *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12 w stosunku 50:50 w postaci kapsułek. Niestety nie wykazano u tych pacjentów zdecydowanie korzystnego wpływu suplementacji CLA na meta-

bolizm insuliny i glukozy, gdyż następowało zwiększenie stężenia glukozy na czczo oraz obniżenie wskaźnika wrażliwości insuliny i podwyższenie wskaźnika insulinooporności. Pacjenci z grupy badanej dobrze reagowali jednak na suplementację CLA biorąc pod uwagę poprawę profilu lipidowego krwi. Mimo że nie stwierdzono wpływu CLA na poziom LDL, to jednak suplementacja diety zdecydowanie zwiększała stężenie HDL oraz prowadziła do znacznego obniżenia stosunku LDL:HDL, co może mieć korzystne znaczenie kliniczne w kontekście zmian miażdżycowych. Ponadto obserwowany wzrost stężenia frakcji HDL dokonał się głównie za sprawą zwiększenia stężenia HDL₂, co wskazuje na wyraźną promocję zwrotnego transportu cholesterolu, a cukrzyca typu drugiego jest jednostką chorobową, w której jest on znacznie osłabiony. Suplementacja CLA powodowała również w grupie badanej redukcję stężenia fibrynogenu w plazmie, co może zmniejszać ryzyko powstawania zakrzepów w naczyniach. Tak rozbieżne skutki wywołane przez podawanie mieszaniny izomerów CLA pacjentom z cukrzycą typu drugiego także wymagają zachowania znacznej ostrożności i dalszych badań, zwłaszcza biorąc pod uwagę olbrzymią ilość dostępnych na rynku suplementów diety zawierających CLA. Również badania prowadzone przez Taylor i wsp. [39] wskazują na konieczność rozważenia w formułowaniu wskazań do stosowania CLA. Zastosowanie przez nich suplementacji diety mieszaniną różnych izomerów CLA u pacjentów o BMI > 27 w ilości 4,5 g/dzień nie spowodowało istotnego spadku masy ciała, ani istotnych zmian profilu lipidowego osocza, wywołało natomiast osłabienie funkcji śródbłonna naczyń oraz wzrost stężenia w moczu F₂ - izoprostanów - markerów stresu oksydacyjnego.

Podsumowanie

Wyniki szeregu badań prowadzonych na zwierzętach wymieniają wiele pozytywnych efektów działania sprzężonych dienów kwasu linolowego, zwłaszcza zapobieganie lub hamowanie pogłębiania się już zapoczątkowanych uszkodzeń miażdżycowych naczyń. Tym niemniej obserwowane liczne rozbieżności sugerują, że wpływy na niektóre z czynników ryzyka, jak np. stężenia lipidów czy lipoprotein w osoczu są nietrwałe lub niekoniecznie korelują z wykazywanymi pozytywnymi działaniami na procesy rozwoju arteriosklerozy. Dlatego też niezbędne wydaje się prowadzenie dalszych prac, zwłaszcza długoterminowych, z użyciem odpowiednio dobranych modeli badawczych, zróżnicowanych układów dawek i form chemicznych izomerów CLA, a także różnych układów dietetycznych, ze względu na sposoby, w jakie inne składniki pokarmu mogą wpływać na efekt działania CLA. Dane uzyskiwane z badań na ludziach, skupiające się zwykle na monitorowaniu poziomów aterogennych lipidów i lipoprotein w osoczu, nie potwierdzają osiąganych najczęściej dodatnich efektów stosowania CLA w kontekście arteriosklerozy na modelach zwierzęcych. Z oczywistych względów nie ma możliwości bezpośredniego określenia wpływu CLA na formowanie płytki miażdżycowej w naczyniach, jak to miało miejsce w przypadku zwierząt. Mimo to wciąż istnieje konieczność dalszych badań nad mechanizmami działania CLA i prowadzenia obserwacji, zwłaszcza długoterminowych badań epidemiologicznych różnorodnych populacji, zanim stanie się możliwe jednoznaczne zarekomendowanie CLA jako

czynnika mającego pozytywny wpływ na zapobieganie i/lub spowalnianie rozwoju miażdżycy naczyń.

II. Źródła pokarmowe CLA

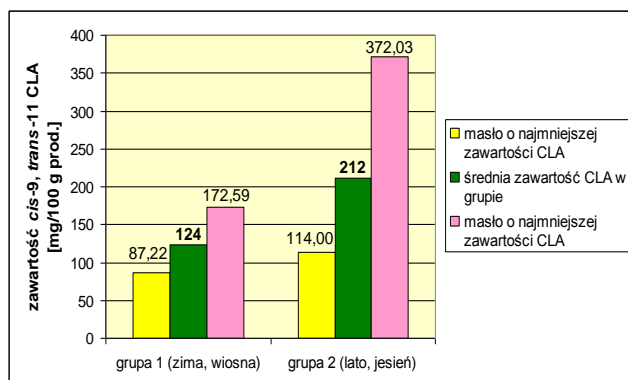
Zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego w produktach mleczarskich

Biorąc pod uwagę możliwość wielokierunkowego oddziaływania sprzężonych dienów kwasu linolowego na organizm ludzki, w Katedrze i Zakładzie Bromatologii przeprowadzono cykl analiz mających na celu oszacowanie zawartości tych związków w produktach mleczarskich. Badano produkty odznaczające się dużą wartością odżywczą ze względu na zbilansowaną zawartość białek, węglowodanów i tłuszczów, a także witamin i składników mineralnych. Materiał do badań stanowiły masła zakupione w handlu detalicznym na rynku warszawskim, oraz dwa masła wykonane samodzielnie przez mechaniczne ubijanie śmietany uzyskanej z mleka od hodowców indywidualnych. Ze względu na czas zakupu materiał badawczy podzielono na dwie grupy: pierwszą - obejmującą masła pozyskane zimą i wiosną 2006 roku, i drugą, do której zaliczono masła pozyskane latem i jesienią 2006 roku. Badaniami objęto ponadto 44 różne rodzaje serów zakupionych w Warszawie w handlu detalicznym, w tym: sery pleśniowe (10) - camembert (7) i brie (3), sery z niebieskim przerostem pleśniowym (10), żółte (17), kozie (5) oraz oscypek i twaróg domowy. Zawartość tłuszczu w badanych produktach oznaczono metodą grawimetryczną, zaś zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego oznaczono metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną stosując kolumnę kapilarną BPX70 (60m x 0,25 mm i.d.) firmy SGE, zgodnie z opisaną uprzednio metodyką [40, 41].

W Tabeli 1 zaprezentowano wyniki zawartości kwasu żwaczowego w badanych masłach. Stanowią one średnią arytmetyczną z trzech równoległych oznaczeń. W grupie pierwszej największą zawartością izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA charakteryzowało się masło Ekstra Oselecza Górska - 173 mg/100 g masła, zaś najmniejszą masło Śmietankowe Olmek - 87 mg/100 g masła. Średnia zawartość *cis*-9, *trans*-11 CLA w pierwszej grupie masel wynosiła 124 mg/100g masła, co odpowiada ilości 1,51 mg w przeliczeniu na 1 g tłuszczu. Spośród masel drugiej grupy największą zawartość izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA stwierdzono również w maśle Oselecza Górska - 372 mg/100g masła, podczas gdy masło Stołowe Garwolin zawierało najmniej badanego izomeru, bo tylko 114 mg/100g masła. Średnia zawartość kwasu żwaczowego w masłach grupy drugiej wynosiła 212 mg/100g masła, co odpowiada 2,65 mg/g tłuszczu. Masła zaliczone do grupy pierwszej charakteryzowały się niższą zawartością CLA w porównaniu do masel grupy drugiej (Ryc.5). Wskazuje to na sezonowe wahania zawartości CLA w maśle, w zależności od tego, z jakiego okresu pochodzi mleko, z którego uzyskana śmietanka służyła jako surowiec do produkcji masła. Wyraźnie różnice te wykazano porównując poziomy kwasu żwaczowego oznaczone w tych samych produktach handlowych zakupionych w różnym czasie, np. Oselecza Górska - 4,72 mg/g tł. w porównaniu do 2,00 mg/g tł. (2,4 x więcej); masło Stołowe Śmietankowe Mławskie - 4,33 mg/g tł. w porównaniu do 1,83 mg/g tł. (2,4 x więcej) czy masło Ekstra Łaciate - 1,93 mg/g tł. w stosunku do 1,63 mg/g tł. (1,2 x więcej).

Tabela 1. Zawartość izomeru *cis*-9, *trans*-11 CLA w badanych masłach ($\bar{X} \pm SD$).

GRUPA 1 (zima, wiosna)			GRUPA 2 (lato, jesień)		
Nazwa masła	Zawartość c9,t11 CLA		Nazwa masła	Zawartość c9,t11 CLA	
	[mg/g tłuszczu]	[mg/100g masła]		[mg/g tłuszczu]	[mg/100g masła]
Ekstra Oselecza Górka	2,00 ± 0,01	173 ± 1	Oselecza Górka	4,72 ± 0,23	372 ± 11
Stółowe Śmietankowe Mława	1,83 ± 0,15	135 ± 1	Stółowe Mławskie Śmietankowe	4,33 ± 0,31	284 ± 15
Ekstra Mlekovita	1,19 ± 0,04	100 ± 5	Ekstra Olmlek	2,57 ± 0,10	210 ± 9
Stółowe Garwolin	1,69 ± 0,40	136 ± 29	Stółowe Garwolin	1,56 ± 0,25	114 ± 19
Ekstra Michowianka	1,59 ± 0,18	137 ± 29	Ekstra Ciechanów	1,88 ± 0,13	155 ± 12
Śmietankowe Olmlek	1,11 ± 0,01	87 ± 1	Ekstra z Warmii	4,35 ± 1,20	362 ± 100
Ekstra Laktopol	1,05 ± 0,15	89 ± 13	Masto "jesienne"	1,35 ± 0,50	116 ± 42
Ekstra Łaciate Mlekpól	1,63 ± 0,27	140 ± 24	Łaciate Ekstra	1,93 ± 0,60	162 ± 8
Osełkowe Ekstra Polmlek	1,56 ± 0,16	134 ± 13	Tradycyjne Polskie Extra	1,66 ± 0,34	139 ± 28
Butterino	1,40 ± 0,22	107 ± 17	Masto „letnie"	2,16 ± 0,37	206 ± 2



Ryc. 5. Porównanie średnich i skrajnych zawartości kwasu żwaczowego w badanych masłach.

Podobne różnice sezonowe obserwowano w innych krajach europejskich. Precht i wsp. [42] w Niemczech oznaczyli następujące poziomy sumy izomerów CLA: zimą - 0,45g CLA/100 g tł., wiosną - 0,76g/100 g tł., latem - 1,55g/100g tł.. Ledoux i wsp. [43] we Francji otrzymali nieco niższe poziomy: zimą - 0,53g/100 g tł. (0,40 g *cis*-9, *trans*-11 CLA/100 g masła), wiosną - 0,68g/100 g tł. (0,52 g *cis*-9, *trans*-11 CLA/100 g masła), latem - 0,97 mg/100g tł. (0,74 g *cis*-9, *trans*-11 CLA/100 g masła), jak również zaob-

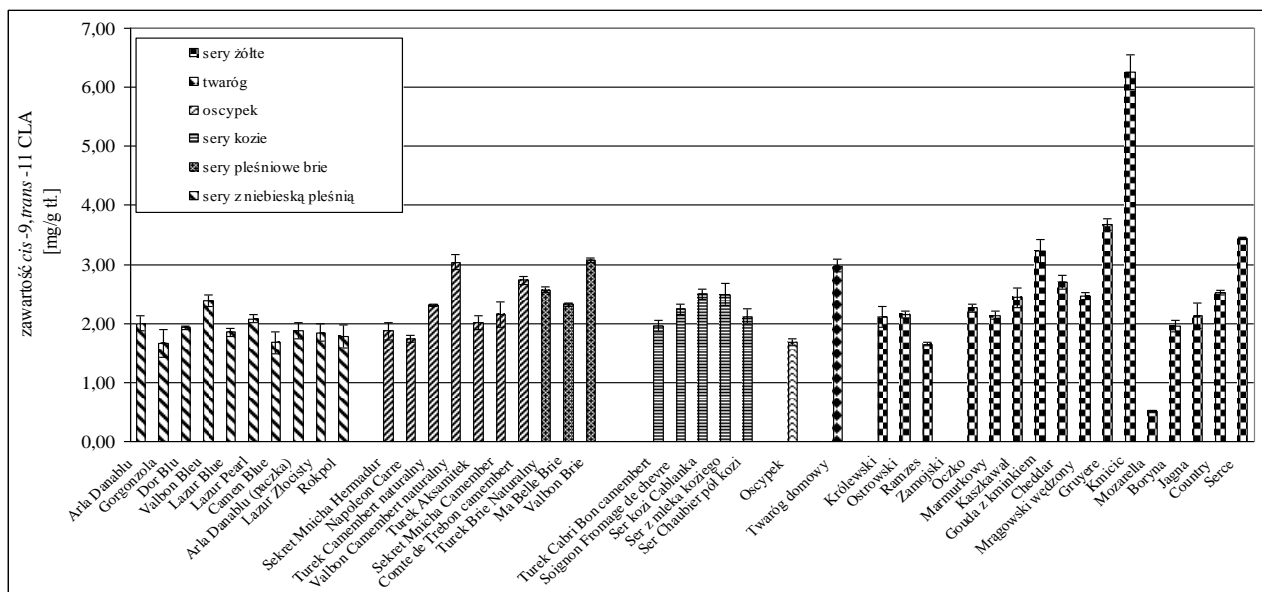
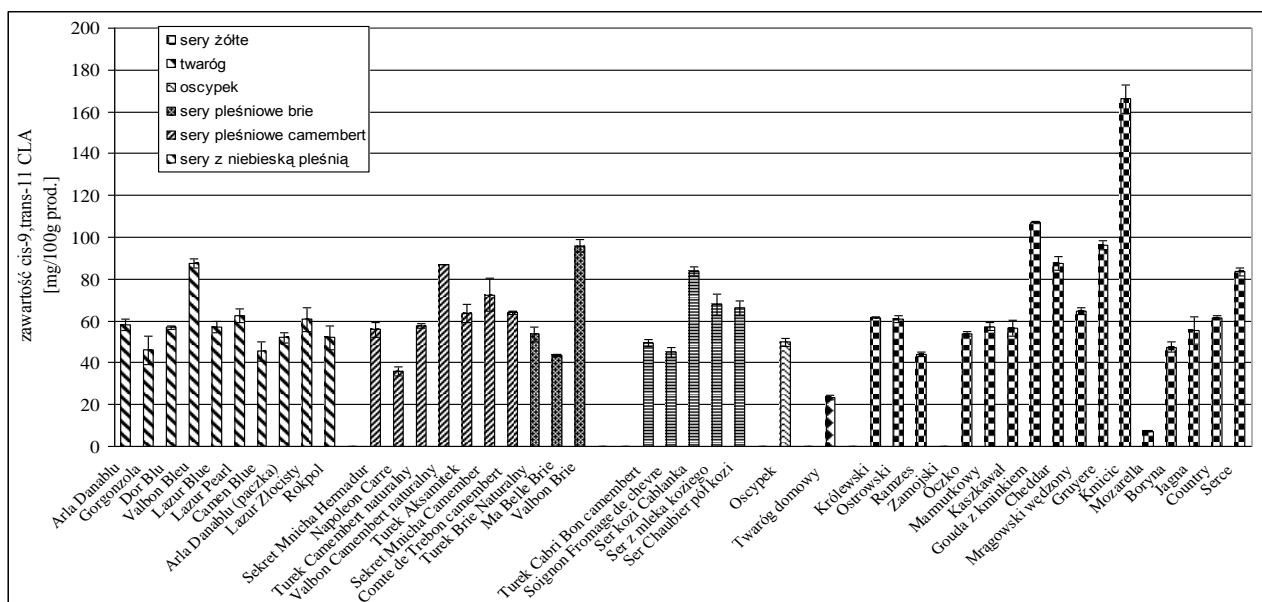
serwowali wyraźne narastanie zawartości CLA w tłuszczu mlecznym od zimy do lata. Jest to prawdopodobnie wynikiem różnej podaży kwasu *trans* wakcenenowego i kwasów linolowego i α -linolenowego w związku ze zmieniającą się sezonowo jakością spożywanych przez zwierzęta traw. Wiosną i latem, gdy zwierzęta otrzymują przede wszystkim świeżą trawę, w której głównymi kwasami tłuszczowymi są kwas linolowy i α -linolenowy, również podaż kwasu wakcenenowego może być nawet 3-4 razy większa niż zimą i jesienią, gdy otrzymują suchą paszę [44, 2]. Ponadto wypasanie zwierząt na pastwiskach pobudza aktywność Δ^9 -desaturazy, co wpływa dodatnio na syntezę CLA [45]

W Tabeli 2 i na rycinach 6 i 7 przedstawiono zawartość kwasu żwaczowego w badanych serach. Sery z niebieską pleśnią wykazywały najmniejszą (z wyjątkiem oscypka) zawartość CLA spośród wszystkich grup badanych serów otrzymywanych z mleka krowiego, zarówno w przeliczeniu na gram tłuszczu (1,91 ± 0,21 mg), jak i na 100 gramów produktu (58 ± 12 mg). Niższą zawartość w całym produkcie wykazywał jedynie twaróg, ze względu na bardzo niską zawartość tłuszczu. Sery z porostem białej pleśni typu camembert i brie charakteryzowały się nieco wyższą średnią zawartością kwasu żwaczowego zarówno w tłuszczu (2,38 ± 0,46 mg/g tł.), jak i w produkcie konsumpcyjnym (63 ± 18 mg/100 g prod.), zaś sery kozie odznaczały się zbliżoną zawartością CLA w przeliczeniu na gram

Tabela 2. Zawartość tłuszczu (%) i kwasu żwaczowego w badanych grupach serów.

	Zawartość tłuszczu [%]		Zawartość <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA [mg/g tł.]		Zawartość <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA [mg/100g prod.]	
	Min. - Max.	$\bar{X} \pm SD$	Min. - Max.	$\bar{X} \pm SD$	Min. - Max.	$\bar{X} \pm SD$
Sery z niebieską pleśnią (10) ^a	27,07 - 36,86	30,0 ± 3,0	1,66 - 2,39	1,90 ± 0,20	45,40 - 87,49	58 ± 12
Sery pleśniowe (10) ^a	18,70 - 33,66	27,0 ± 5,0	1,74 - 3,07	2,40 ± 0,50	36,07 - 95,82	63 ± 18
Sery kozie (5) ^a	19,96 - 33,41	27,0 ± 5,0	1,96 - 2,50	2,26 ± 0,23	44,84 - 83,56	62 ± 16
Sery żółte (17) ^a	14,35 - 35,89	26,0 ± 5,0	0,50 - 6,26	2,40 ± 1,40	7,21 - 166,24	65 ± 36
Oscypek	-	29,7 ± 0,6	-	1,70 ± 0,10	-	50 ± 4
Twaróg	-	7,9 ± 0,2	-	3,00 ± 0,20	-	23 ± 2

^a Liczba analizowanych gatunków sera

Ryc. 6. Zawartość *cis-9, trans-11* CLA w tłuszczu badanych serów (mg/g tł.).Ryc. 7. Zawartość *cis-9, trans-11* CLA w badanych serach (mg/100 g prod.).

tłuszczu (średnio $2,26 \pm 0,23$ mg) i bardzo zróżnicowaną zawartością tego związku w przeliczeniu na 100 gramów całego produktu (średnio 62 ± 16 mg), co jest skutkiem znacznych różnic w zawartości tłuszczu pomiędzy poszczególnymi serami tej grupy. Oscypek, będąc jedynym przedstawicielem serów owczych wśród badanych serów wykazywał bardzo niską zawartością CLA - odpowiednio $1,68 \pm 0,10$ mg/g tł. i 50 ± 4 mg/100 g produktu. Sery żółte okazały się być grupą produktów zawierającą największe ilości izomeru CLA spośród wszystkich badanych grup serów (średnio $2,4 \pm 1,4$ mg/g tł. i 65 ± 36 mg/100 g prod.). Ponadto odznaczały się dość dużymi różnicami pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej grupy.

Interesujące są wyniki uzyskane dla sera Zamojskiego, w przypadku którego nie stwierdzono obecności izomeru *cis-9, trans-11* CLA nawet w śladowych ilościach. Analiza chromatograficzna tego sera wykazała również znaczne różnice jakościowe i ilościowe w puli kwasów

tłuszczowych. W celu potwierdzenia otrzymanych rezultatów analizie poddano inną partię sera Zamojskiego, uzyskując analogiczne wyniki. Pod względem organoleptycznym zaś ser Zamojski nie różnił się od innych serów żółtych, nie był również w żaden specjalny sposób oznakowany przez producenta. Celowe wydaje się dokładniejsze zbadanie tego przypadku poprzez przeprowadzenie analizy serów Zamojskich produkowanych przez inne mleczarnie, jak również poprzez poddanie analizie innych serów produkowanych przez tego producenta.

Na zawartość CLA w produktach mlecznych ma wpływ wiele czynników, spośród których do najistotniejszych należą: jakość mleka użytego jako surowca, rodzaj bakterii, którymi zaszczepiono mleko [46], długość okresu dojrzewania i warunki, w jakich ono zachodzi [47], a także czynniki technologiczne zależne od procesu produkcji [48].

Wykazano że kraje, w których spożycie serów jest szczególnie wysokie (Grecja, Francja, Włochy), charaktery-

zużą się niższą umieralnością z powodu raka piersi, niż kraje o niższym spożyciu tych produktów (Irlandia, Wielka Brytania, Belgia, Holandia) [48]. W innych prowadzonych badaniach obserwacje grupy osób predysponowanych do wystąpienia chorób układu krążenia wykazały, że ryzyko rozwoju choroby wieńcowej w grupie spożywającej w codziennej diecie masło jest znacznie niższe niż w grupie zastępującej masło margaryną [49]. Wyniki tych i wielu podobnych badań potwierdzają, jak ważne jest poznanie ogólnodostępnych źródeł substancji o właściwościach prozdrowotnych. Znajomość zawartości CLA może stanowić dla konsumenta, świadomego znaczenia diety w ochronie zdrowia, jeden z powodów podjęcia decyzji o zakupie danego produktu spożywczego.

WYKAZ SKRÓTÓW

ATP	- adenozyntrifosforan
CLA	- sprzężone dieny kwasu linolowego
TC	- cholesterol całkowity
HDL	- lipoproteiny o dużej gęstości
PPAR γ	- receptory aktywowane proliferatorami peroksyosomów typu γ
PPAR α	- receptory aktywowane proliferatorami peroksyosomów typu α
ACE	- angiotensyna I
VLDL	- lipoproteiny o bardzo małej gęstości
LDL	- lipoproteiny o małej gęstości
IDL	- lipoproteiny o pośredniej gęstości
LXR	- wątrobowy receptor X
IL-1 β	- interleukina 1
COX-2	- cyklooksigenaza 2
TNF- α	- czynnik martwicy nowotworów

BIBLIOGRAFIA

1. Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. red. Kostowski W., Wyd. II poprawione, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001; 234.
2. Obiedziński M.W., Bartnikowska E., Grześkiewicz S.: Występowanie sprzężonych dienów kwasu linolowego w produktach żywnościowych. Sympozjum „Olej z nasion wiesiołka i inne oleje, zawierające kwasy tłuszczowe n-6 lub n-3 w profilaktyce i terapii”, 1998; 47-52.
3. Turpeinen A.M., Mutagen M., Aro A. et al.: Bioconversion of Vaccenic Acid to Conjugated Linoleic Acid in Humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 76:504-510.
4. Mosley E.E., Mc Guire M.K., Williams J.E., Mc Guide M.A.: Cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized from Vaccenic Acid in Lactating Women. *J. Nutr.*, 2006; 136:2297-2301.
5. Pariza M.W., Park Y., Cook M.E.: The biologically active isomers of conjugated linoleic acid, *Progress In Lipid Research*, 2001; 40:283-293.
6. Pariza M.W., Asheer S.H., Chu I.S., Lund D.H.: Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.*, 1979; 7:63-9.
7. Pariza M.W., Hargraves W.A.: A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*, 1985; 6:591-593.
8. Mazzo-Welch P.A., Zangani D., Ip C., Vaughan M.M., Shoemaker S., Ramirez R.A., Ip M.M.: Inhibition of Angiogenesis by the Cancer Chemopreventive Agent Conjugated Linoleic Acid, *Cancer Res.*, 2002; 62: 4383-4389.
9. Pryor M., Slattery M.L., Robinson L.M., Egger M.: Adolescent diet and breast cancer in Utah, *Cancer Res.*, 1989; 49: 2161-2167.
10. Frazie A.L., Ryan C.T., Rockett H., Willett W.C., Colditz G.A.: Adolescent diet and risk of breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 2003; 5: R59-R64.
11. Thompson H., Zhu Z.J., Banni S., Darcy K., Lotus T., Ip C.: Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk, *Cancer Res.*, 1997; 57: 5067-5072.
12. National Research Council (NRC): Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet, National Academy Press, Washington DC, 1996
13. Munday J.S., Thompson K.G., James A.C.: Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br. J. Nutr.*, 1999; 81:251-255.
14. Nestel P., Fujii A., Allen T.: The cis-9,trans-11 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentration but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 2006; 189:282-287.
15. Toomey S., Harhen B., Roche H.M. et al.: Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*, 2006; 187:40-49.
16. Arbonés-Mainar J.M., Navarro M.A., Guzmán M.A. et al.: Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*, 2006; 189:318-327.
17. Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S. et al.: Influence of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Establishment and Progression of Atherosclerosis in Rabbits. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2000; 19(4):472S-477S.
18. Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S., Czarnecki S.K.: Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr. Res.*, 2002; 22:1275-1279.
19. Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S. et al.: Conjugated Linoleic Acid Isomer Effects in Atherosclerosis: Growth and Regression of Lesions. *Lipids*, 2004; 39:611-616.
20. Nagao K., Inoue N., Wang Y.-M. et al.: The 10trans,12cis isomer of conjugated linoleic acid suppress the development of hypertension in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 306:134-138.
21. Inoue N., Nagao K., Hirata J. et al.: Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 323:679-684.
22. Deckere E.A.M., van Amelsvoort J.M.M., Neill G.P., Jones P.: Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.*, 1999; 82:309-317.
23. Gavio V.C., Gavio G., Leblanc M.-J. Tuchweber B.: An isomeric Mixture of Conjugated Linoleic Acids But Not Pure cis-9,trans-11-Octadecadienoic Acid Affects Body Weight gain and Plasma Lipids in Hamsters. *J. Nutr.*, 2000; 130:27-29.
24. Navarro V., Zabala A., Macarulla M.T. et al.: Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. *J. Physiol. Biochem.*, 2003; 59(3):193-200.
25. Valeille K., Grippo D., Bloquit M.-F. et al.: Lipid atherogenic risk markers can be more favorably influenced by the cis-9,trans-11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *Br. J. Nutr.*, 2004; 91:191-199.
26. Lock A.L., Horne C.A.M., Bauman D.E., Salter A.M.: Butter Naturally Enriched in Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid Alters Tissue Fatty Acids and Improves the Plasma Lipoprotein Profile in Cholesterol-Fed Hamsters. *J. Nutr.*, 2005; 135:1934-1939.
27. Valeille K., Férézou J., Amsler G. et al.: A cis-9,trans-11-conjugated Linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005; 289:H652-H659.
28. Valeille K., Férézou J., Parquet M. et al.: The Natural Concentration of the Conjugated Linoleic Acid, cis-9,trans-11, in Milk Fat Has Antiatherogenic Effects in Hyperlipidemic Hamster. *J. Nutr.*, 2006; 136:1305-1310.
29. Mitchell P.L., Langille M.A., Currie D.L., McLeod R.S.: Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1734:269-276.
30. Wilson T.A., Nicolosi R.J., Saati A. et al.: Conjugated Linoleic Acid Isomers Reduce Blood Cholesterol Levels but Not Aortic Cholesterol Accumulation in Hypercholesterolemic Hamster. *Lipids*, 2006; 41:41-48.
31. Navarro V., Macarulla M.T., Fernández-Quintela A. et al.: Effects of trans-10,cis-12 conjugated Linoleic acid on cholesterol metabolism in hypercholesterolaemic hamsters. *Eur. J. Nutr.*, 2007; 46:213-219.
32. Moya-Camarena S.Y., Belury M.A.: Species Differences in the Metabolism and Regulation of Gene Expression by Conjugated Linoleic Acid. *Nutr. Rev.*, 1999; 57(11):336-340.
33. Biochemia Harpera. Wyd. V, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004; 354.

34. Mougios V., Matsakas A., Petridou A. et al.: Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.*, 2001; 12:585-594.
35. Tricon S., Burge G.C., Kew S. et al.: Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 80:614-620.
36. Tricon S., Burge G.C., Jones E.L. et al.: Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood profile in healthy middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006; 83:744-753.
37. Risérus U., Smedman A., Basu S., Vessby B.: Metabolic effects of conjugated linoleic acid in humans: the Swedish experience. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 79:1146S-1148S.
38. Moloney F., Yeow T.-P., Mullen A. et al.: Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patient with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 80:887-895.
39. Taylor J.S.W., Williams S.R.P., Rhys R. et al.: Conjugated Linoleic Acid Impairs Endothelial Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26:307-312.
40. Tokarz A., Biatek A., Stawarska A., Gołębiowska L.: Porównanie zawartości sprzężonych dienów kwasu linolowego - CLA w masłach dostępnych na rynku warszawskim w 2006 roku. *Żywnienie człowieka i metabolizm*, 2007; 1/2:118-127.
41. Tokarz A., Biatek A., Krasowska M.: Ocena zawartości kwasu żwaczowego (cis-9, trans-11 CLA) w wybranych gatunkach serów. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 3: 580-584.
42. Precht D., Molketin J.: Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further cis-/trans- isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1999; 51:63-78.
43. Ledoux M., Chardigny J. - M., Darbois M., Soustre Y., Sebedio J. - L., Laloux L.: Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers, *J. Food Comp. Anal.*, 2005; 18:409-425.
44. Jensen R.G.: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000, *J. Dairy Sci.*, 2002; 85:295-302.
45. Tanaka K.: Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions, *Animal Science Journal*, 2005; 76:291-303.
46. Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P., Eyer H.: Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - a review. *International Dairy Journal*, 2004; 14:1-15.
47. Lavillonniere F., Martin J. C., Bougnoux P., Sebedio J.-L.: Analysis of Conjugated Linoleic Acid and Content in French Cheeses. *JAOCs*, 1998; 75, 3:343-352.
48. Zlatanov S., Laskaridis K., Feist C., Sagredos A.: CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 2002; 78:471-477.
49. McGuire M. A., McGuire M. K.: Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proceeding of the American Society of Animal Science*, 1999; <http://www.asas.org/symposia/9899proc/0938.pdf>.