Utjecaj spola na masnokiselinski sastav tkiva kunića

Radić Brkić, Nelly

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:455534

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Nelly Radić

Utjecaj spola na masnokiselinski sastav tkiva kunića

ZAGREB, 2017

ZAVOD ZA STOČARSTVO

PREDSTOJNICA prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin

MENTORI: Izv. prof. dr. sc. Tomislav Mašek
dr. sc. Kristina Starčević

ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:

1. Izv. prof. dr. sc. Krešimir Severin
2. dr. sc. Kristina Starčević
3. izv. prof. dr. sc. Tomislav Mašek
4. Prof. dr. sc. Petar Džaja (zamjena)

Sadržaj

1. **Uvod**.....2
2. **Materijal i metode**.....6
2.1. Životinje.....6
2.2. Određivanje sastava masnih kiselina.....6
2.3. Statistička obrada podataka.....7
3. **Rezultati**.....8
4. **Rasprava**.....11
5. **Zaključci**.....12
6. **Literatura**.....13
7. **Sažetak**.....14
8. **Summary**.....15
9. **Životopis**.....16

1. Uvod

Masne kiseline su alifatske monokarboksilne kiseline karakterizirane terminalnom karboksilnom skupinom (R-COOH). Viši članovi ovog niza pojavljuju se u prirodi u obliku estera glicerola (masti) zbog čega se cijela obitelj ovih spojeva naziva masne kiseline. Prirodne masne kiseline u svom lancu imaju paran broj ugljikovih atoma jer tijekom lipogeneze dolazi do produljenja lanca za dva C atoma (Karlson, 1993).

Masne kiseline se sintetiziraju u svim tkivima kondenzacijom acetil-CoA i posredovanjem različitih enzima u prisutnosti reduciranog koenzima NADPH i energijom iz molekule ATP-a. Sinteza masnih kiselina događa se u citosolu, a β-oksidacija (njihova razgradnja) u mitohondriju i peroksisomima. Acetil-CoA ne može proći unutarnju membranu mitohondrija pa mora reagirati s oksalacetatom da bi nastao citrat koji može izaći iz mitohondrija. U citosolu se citrat djelovanjem liaze razgradi na acetil-CoA i oksalacetat uz potrošak jedne molekule ATP-a. Oksalacetat se zatim reducira u malat koji ponovno ulazi u mitohondrij. To je važno jer bi mitohondrij osiromašio u C4-dikarboksilnim kiselinama koje su važne za održavanje ciklusa limunske kiseline. Zbog toga za svaki mol citrata koji izlazi iz mitohondrija ulazi jedan mol malata. Sinteza masnih kiselina zbiva se na multienzimnom kompleksu: sintazi masnih kiselina. Acetil-CoA mora se najprije karboksilirati u malonil-CoA uz acetil-CoA-karboksilazu koja sadrži biotin, zatim se acetilni i malonilni ostatak kondenziraju uz dekarboksilaciju. Daljnje reakcije teku obratnim slijedom od onih u β-oksidaciji. Pritom je potreban NADPH koji nastaje kad i pentoza u pentoza-fosfatnom putu oksidativnom dekarboksilacijom. Sada nastaje kiselina koja je duža za dva ugljikova atoma. Kada se nakon osam ili devet ciklusa sinteze sintetizira masna kiselina od šesnaest ili osamnaest ugljikovih atoma koja se odvoja od multiezimnog kompleksa. U životinjskim stanicama to se zbiva hidrolizom gdje nastaje masna kiselina koja difundira iz kompleksa i može poslužiti intracelularno za sintezu drugih masnih kiselina, koje zatim sudjeluju u izgradnji lipida ili odlaze u krv vežući se za albumine (Lutkić i Jurić, 2008).

Fizikalna svojstva masnih kiselina ovise o duljini lanca, stupnju nezasićenosti i razgranatosti lanca. Kiseline s kratkim lancem su tekućine oštrog mirisa i topive u vodi. Porastom duljine lanca talište im raste, a topivost u vodi opada.

Masne kiseline s obzirom na stupanj nezasićenosti dijelimo na zasićene i nezasićene masne kiseline.

Zasićene masne kiseline predstavljaju masne kiseline koje u svojoj strukturi ne posjeduju dvostruku (nezasićenu) vezu između C atoma. . Zasićene masne kiseline tvore ravne lance atoma i kao rezultat toga mogu se zgusnuto skladištiti u organizmu, dopuštajući veću količinu energije po jedinici volumena. Masno tkivo čovjeka sadrži velike količine dugolančanih zasićenih masnih kiselina. Skraćeni opisni naziv masnih kiselina sadrži samo broj atoma ugljika i broj jednostrukih ili dvostrukih veza u njima (npr. C18:0 ili 18:0 - stearinska kiselina - sadrži 18 atoma ugljika i 0 dvostrukih veza između atoma ugljika, dok C18:1 - oleinska kiselina - sadrži osim 18 atoma ugljika i jednu dvostruku vezu i zato je ona nezasićena masna kiselina).

Nezasićene masne kiseline su kiseline koje u svojoj strukturi imaju dvostruke veze između dva ugljikova atoma u lancu. Prema broju nezasićenih veza koje posjeduju u alifatskom lancu dijelimo ih na jednostrukonezasićene i višestrukonezasićene masne kiseline. Jednostrukonezasićene masne kiseline imaju u svojoj strukturu jednu nezasićenu vezu između dva C atoma. Višestrukonezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acids PUFA) su masne kiseline s dvije ili više dvostrukih veza između dva ugljikova atoma u ugljikovodičnom lancu masnih kiselina. Pojednostavljena nomenklatura, koja se često koristi za klasifikaciju PUFA u biološkim sustavima je omega (ω) ili n nomenklatura, prema kojoj se označava položaj posljednje dvostruke veze od metilnog kraja ugljikovodičnog lanca. Delta (Δ) klasifikacija označava poziciju dvostruke veze u lancu masne kiseline određenu brojanjem veza počevši od karboksilne skupine. Dvostruke veze u nezasićenim masnim kiselinama se većinom u biološkim sustavima nalaze u *cis* konfiguraciji dok *trans* konfiguracije nastaje kao posljedica utjeca čovjeka. Najčešće nezasićene masne kiseline koje se pojavljuju u biološkim sustavima su ω -6 i ω-3, a broj atoma ugljika u ugljikovodičnom lancu obično varira između 18 i 22 i gotovo uvijek je paran, dok broj dvostrukih veza može varirati između dvije do šest. Za razliku od zasićenih masnih kiselina u kojima jednostruke veze tvore ravne lance, dvostruke veze u *cis* konfiguraciji uzrokuju zakrivljenost lanaca nezasićenih masnih kiselina.

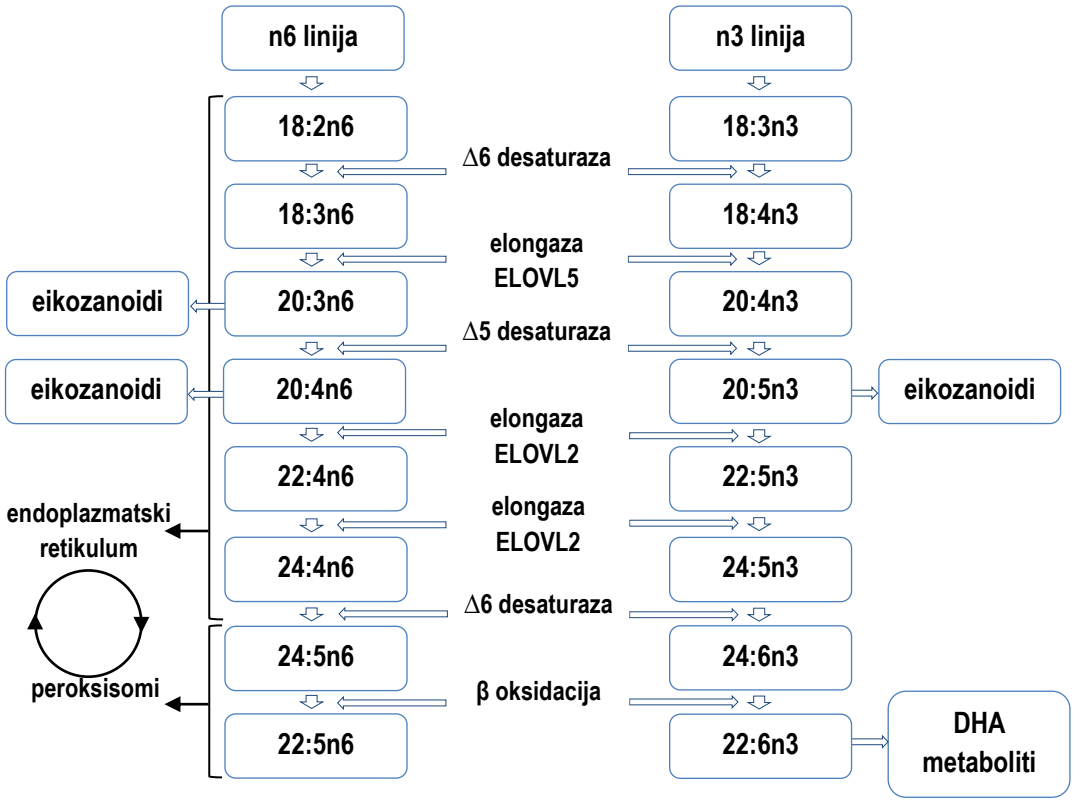
Najzastupljenije PUFA u biološkim sustavima su:

PUFA	skraćenice	klasa
linolna	LA	18:2, ω-6
α-linolenska	ALA	18:3, ω-3
γ-linolenska	GLA	18:3, ω-6
dihomo-γ-linolenska	DGLA	20:3, ω-6
arahidonska	AA	20:4, ω-6
eikosapentaenska	EPA	20:5, ω-3
dokosapentaenska	DPA	22:5, ω-6
dokosaheksaenska	DHA	22:6, ω-3

Za razliku od većine algi, gljiva i biljaka koji su sposobni sintetizirati *de novo* sve potrebne masne kiseline uključujući i PUFA, za većinu životinjskih vrsta su PUFA esencijalne i u organizam se unose hranom. S obzirom da ih ne mogu sintetizirati *de novo* ω-3 i ω-6 PUFA, kod životinja kao i kod čovjeka linolna (18:2, ω-6) i α-linolenska (18:3, ω-3) kiselina predstavljaju esencijalne masne kiseline. Kako bi se iskoristio njihov puni potencijal one se putem Δ5 i Δ6 desaturaza i srodnih elongaza prevode nizom reakcija u fiziološki važne dugolančane PUFA, od kojih su najzastupljenije arahidonska (20:4, ω -6), eikosapentaenska (20:5, ω-3) i dokosaheksaenska (22:6, ω-3) kiselina (Shema 1.). Biokonverzija n3 i n6 masnih kiselina odvija se u endoplazmatskom retikulumu i između njih postoji kompeticija za iste enzime uključene u proces desaturacije i elongacije.

Na metabolizam masnih kiselina veliki utjecaj imaju spol i spolni hormoni. Istraživanja su pokazala da žene imaju povišenu koncentraciju cirkulirajuće dokosaheksaenoične kiseline (DHA) u odnosu na muškarce, neovisno o prehrani. Ta razlika može biti objašnjena činjenicom da žene imaju veći postotak tjelesnog masnog tkiva u odnosu na muškarce. U žena je isto tako uočen i veći stupanj ß-oksidacije masnih kiselina. Saznanja o utjecaju spolnih hormona na metabolizam masnih kiselina su prikupljanja proučavanjem žena koje su uzimale oralne kontraceptive ili hormonsku nadomjesnu terapiju ili pak prateći promjene kod transeksualnih osoba prilikom procesa promjene spola. Žene koje su uzimale oralne kontranceptive su imale povišenu koncentraciju cirkulirajuće DHA u odnosu na žene koje ih nisu uzimale. Sličan efekt povećanja DHA je zabilježen i kod žena koje su primale hormonsku nadomjesnu terapiju. Zanimljive spoznaje pružila su i istraživanja na transeksualnim osobama. Uočeno je da su osobe koje su prolazile tranziciju s muškog na ženski spol te primale etinil estradiol I ciproteronacetat

imale povišenu DHA 4 mjeseca nakon početka tretmana. Suprotan efekt, to jest, smanjenje cirkulirajuće DHA uočeno je kod osoba koje su prolazile tranziciju s muškog na ženski spol. Autori pretpostavljalju da razlog tome nije u povišenom testosteronu nego u smanjenju cirkulirajućeg estrogena.

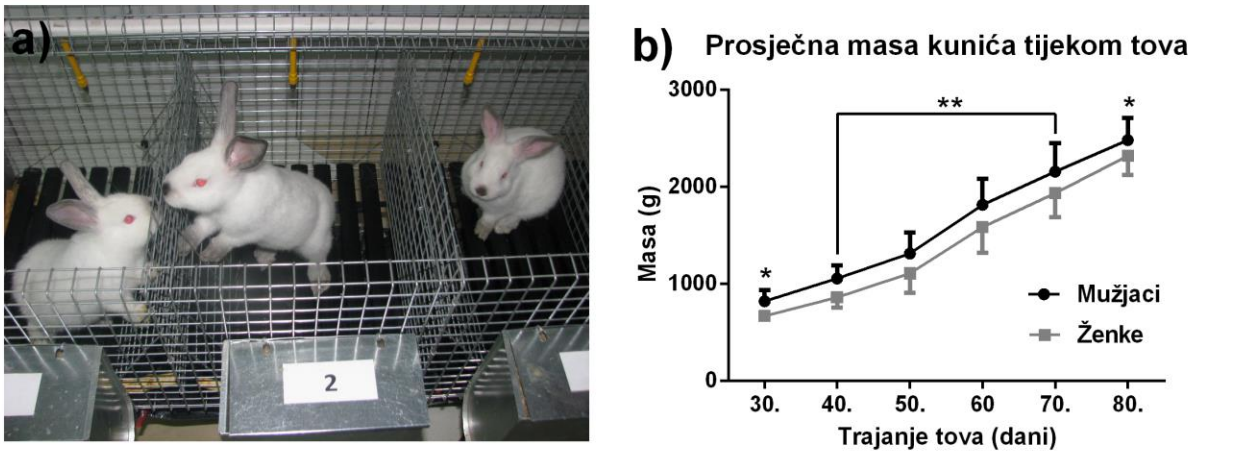


Shema 1. *Shematski prikaz sinteze masnih kiselina n-3 i n-6 linije*

2. Materijal i metode

2.1. Životinje

U istraživanju je korišteno 20 kunića kalifornijske pasmine, i to po 10 životinja svakog spola. Početak iatraživanja je bio kada su kunići bili stari 30 dana i tov je trajao do 80. dana starosti. Kunići su tijekom tova hranjeni standardnom smjesom za tov kunića bez ograničenja. Tijekom tova vodu su dobivali preko poluautomatskih pojilica bez ograničenja.



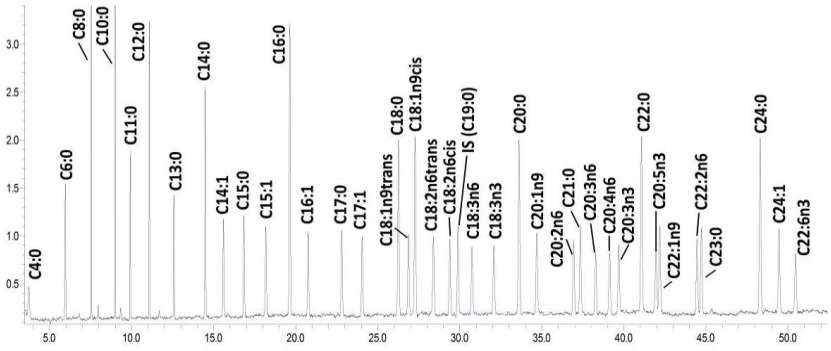
Slika 1. Pokusne životinje kalifornijske pasmine individualno držane u žičanim kavezima (a) i prosječne mase muških i ženskih kunića tijekom tova u razdobljju od 30. do 80. dana.

2.2. Određivanje sastava masnih kiselina

Masne kiseline izolirane su iz tkiva jetre i m. iliotibialis cranialis pomoću mješavine kloroforma i metanola (2:1, v/v). Dobiveni ukupni lipidi su otopljeni u 100 µl mješavine kloroforma i metanola (2:1, v/v) uz dodatak 0,03% betahidroksitoluena (BHT) kao antioksidanta. Takvi lipidi su pohranjeni na -80°C do daljnje analize.

Derivatizacija masnih kiselina u metil estere napravljena je transesterifikacijom pomoću 2M KOH u metanolu pri sobnoj temperaturi. Dobiveni esteri masnih kiselina analizirani su na plinskom kromatografu (Gas Chromatograph GC 2010 Plus; Shimadzu,Kyoto, Japan) s

kapilarnom kolonom ZB WAX (Phenomenex, Torrance, CA, USA) i helijem kao plinom nosiocem te korištenjem FID detektora. Pojedine masne kiseline identificirane su primjenom eksternog standarda (37 Component FAME mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Sastav masnih kiselina predstavljen je kao molarni %.



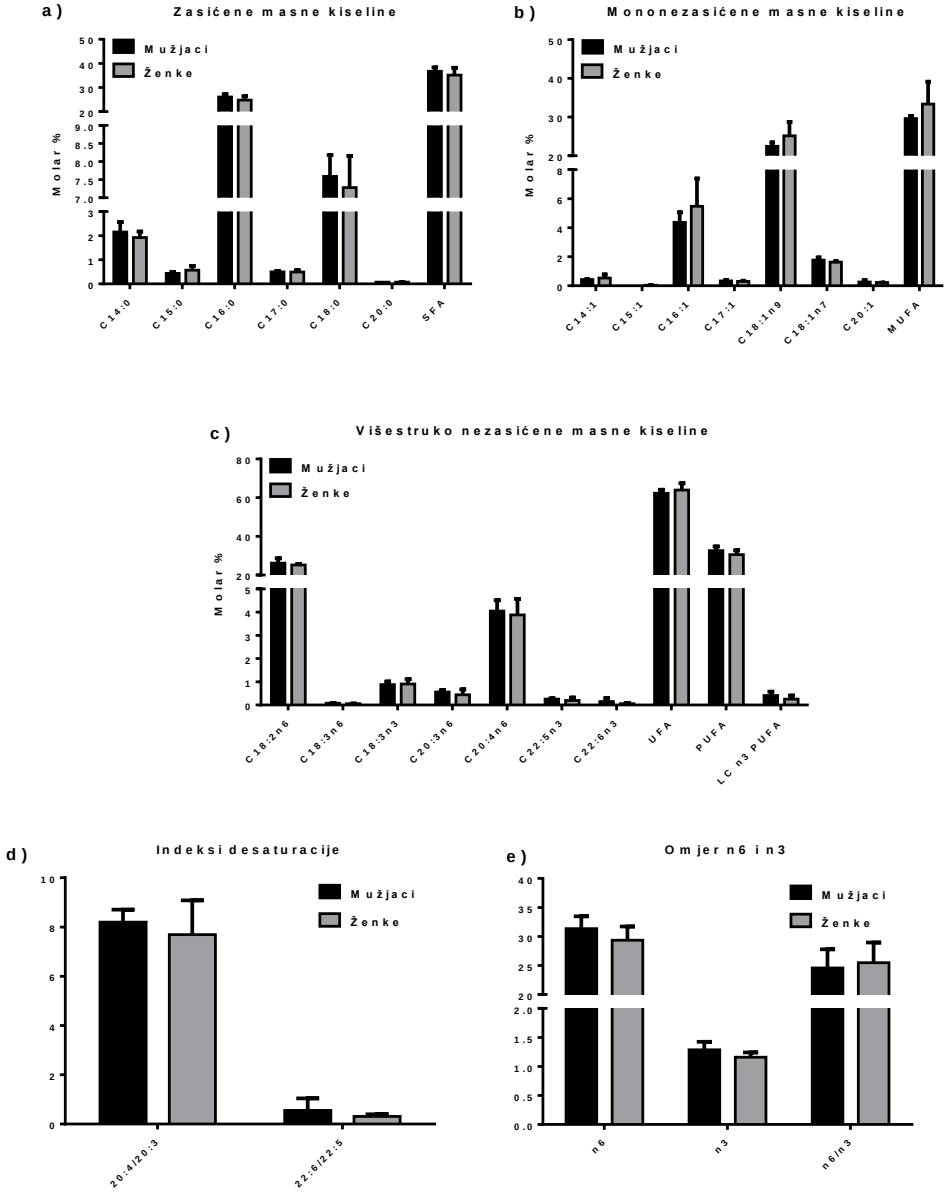
Slika 2. *Reprezentativni kromatogram standarda Supelco 37 component FAME mix.*

2.3. Statistička obrada podataka

Dobivene vrijednosti su analizirane primjenom statističkog programa Statistica 2010 program (Statistica, Tulsa, OK, USA). Prije utvrđivanja statističkih rezultata, svi podaci su testirani na normalnost distribucije primjenom Shapiro-Wilks testa. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i standardna pogreška. Primjenom t-testa analizirana je statistička značajnost razlika sastava masnih kiselina i njihovog sumiranog profila. Razlike su smatrane statistički značajnim ako je $P < 0.05$.

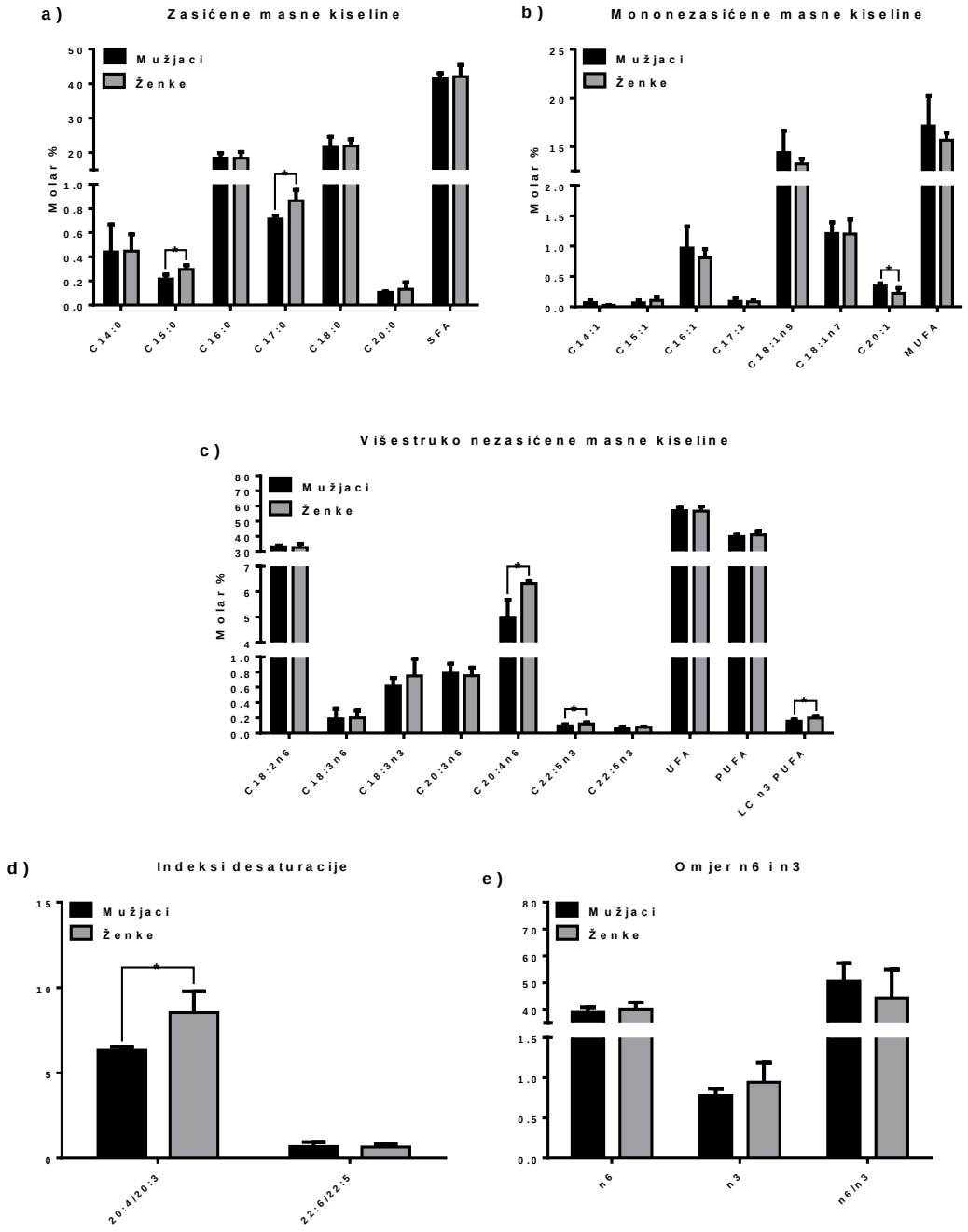
3. Rezultati

U mišićnom tkivu kunića istraživali smo zasićene masne kiseline, mononezasićene masne kiseline, višestruko nezasićene masne kiseline, indeks desaturacije i n6/n3 omjer. Nismo pronašli ni jednu značajnu razliku u količini masnih kiselina u mišićnom tkivu kunića s obzirom na spol.



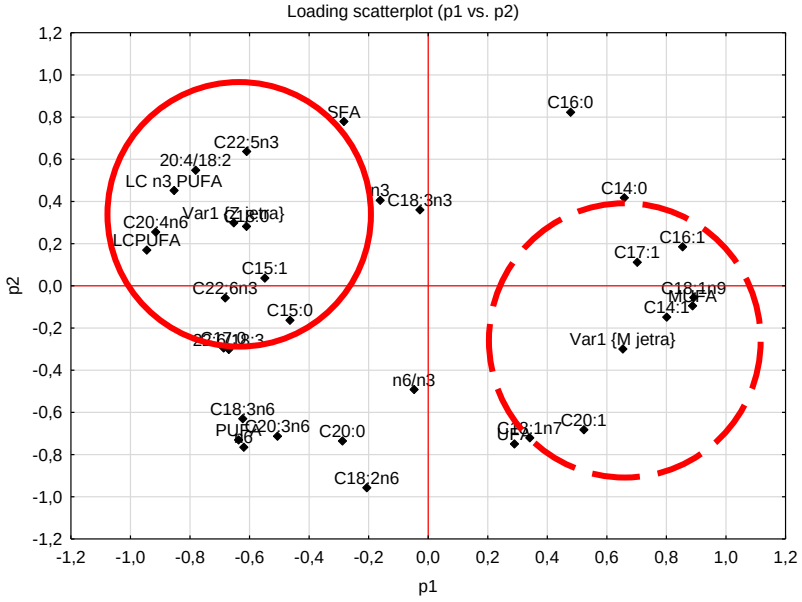
Slika 3. *Utjecaj spola na masnokiselinski sastav mišićnog tkiva kunića (m. iliotibialis cranialis). a) zasićene masne kiseline, b) mononezasićene masne kiseline, c) višestruko nezasićene masne kiseline, d) indekse desaturacije i e) n6/n3 omjer.*

Od zasićenih masnih kiselina prevladavale su palmitinska (16:0) te stearinska (18:0), od mononezasićenih masnih kiselina najzastupljenije su palmitoleinska (16:1) i oleinska (18:1), a od višestruko nezasićenih masnih kiselina najviše ima linolne (18:2) te arahidonske (20:4).



Slika 4. *Utjecaj spola na masnokiselinski sastav jetre kunića. a) zasićene masne kiseline, b)mononezasićene masne kiseline, c) višestruko nezasićene masne kiseline, d) indekse desaturacije i e) n6/n3 omjer.*

U jetri kunića također smo istraživali zasićene masne kiseline, mononezasićene masne kiseline, višestruko nezasićene masne kiseline, indeks desaturacije i n6/n3 omjer. Pronašli smo značajnu razliku u količini masnih kiselina u jetri kunića s obzirom na spol. Od zasićenih masnih kiselina, pentadekanska (15:0) te heptadekanska (17:0) masna kiselina su bile zastupljenije kod ženskih kunića. Od mononezasićenih masnih kiselina, cis-11-eikozenska (20:1) je bila zastupljenija u tkivu mužjaka. Jedinke ženskog spola imale su značajno veće koncentracije arahidonske kiseline (C20:4n6). Ženke su također imale višu razinu ukupnih polinezasićenih masnih kiselina n3 linije (LC n3 PUFA) te značajno viši indeks desaturacije 20:4/18:2, što ukazuje na povećanu aktivnost Δ5 desaturaze.



Slika 5. *Analiza principalnih komponenti. Crvenim krugovima su označene varijable koje najviše doprinose razlikama između spolova (puni krug, ženke; isprekidani krug, mužjaci).*

4. Rasprava

U ovom istraživanju utvrđene su pojedine razlike u masnokiselinskom sastvavu tkiva jetre kunića dok u mišićnom tkivu razlika nije bilo. Kod zasićenih masnih kiselina razlika je bila samo u C17:0 te kod mononezasićenih kod C20:1. Obje ove kiseline su manje značajne u metabolizmu jer nisu prekursori značajnih masnih kiselina s većim brojem C atoma i/ili više nezasićenih veza pa njihova razlike ne predstavlja značajan biološki podatak. Nasuprot našim podacima kod štakora postoje značajne razlike u sastavu tkiva jetre kod važnih masnih kiselina poput stearinske i palmitinske (Starčević i sur., 2016, Alessandri i sur., 2012). Kod štakora te razlike su u većem sadržaju palmitinske kiseline (C16: 0) kod mužjaka i većem sadržaju stearinske kiseline (C18: 0) kod ženki. Ovi rezultati mogu biti objašnjeni višom stopom elongacije C16:0 u C18: 0 kod ženki štakora što je vidljivo i iz omjera produkt/prekursor.

Slično tome kod štakora se mogu uočiti i veće razlike kod mononezasićenih masnih kiselina poput povećanja razine C16:1 i C18:1n7 kod muških životinja. Ove razlike su vjerojatno posljedica povećane aktivnosti delta-9-desaturaze koja uvodi jednu dvostruku vezu u palmitinsku pri čemu nasnaje palmitoleinska masna kiselina (C16:1n7), a nakon toga njenom elongacijom i C18:1n7 masna kiselina (Starčević i sur., 2016). Spolne razlike uočene kod C18:0 i C16:0 ne odnose se na razlike u važnosti PUFA (C20:4n6 i C22:6n3), budući one nastaju produženjem lanca iz esencijalnih masnih kiselina koje dobivamo hranom.

Od višestruko nezasićenih masnih kiselina n6 linije u našem istraživanju bila je povišena razina arahidonske masne kiseline kod ženskih životinja. Ova kiselina nastaje aktivnosti delta-5-desaturaze iz masne kiseline s 20 uglikovih atoma i 3 dvostruke veze (Jump i sur., 2013). Iz ovog razloga može se pretpostaviti kako je kod ženki kunića povišena aktivnost upravo delta-5-desaturaze što potvrđuje i značajno viši omjer indeksa delta-5-desaturacije (20:4n6/20:3n6). Istovremeno je kod ženskih životinja bila povišena i ukupna razina dugolančanih n3 masnih kiselina. Oba ova rezultata, povećanje i n3 i n6 dugolančanih masnih kiselina primijećeno je i kod ženskih životinja drugih vrsta (štakori) te ljudi (Williams, 2000). Iako nije u potpunosti jasno zašto ženske životinje imaju povišenu razinu ovih masnih kiselina neke od pretpostavki su kako se možda radi o prilagodbi za graviditet jer razvitak ploda zahtijeva visoke razine dugolančanih nezasićenih masnih kiselina (Childs i sur., 2000).

5. Zaključci

Masnokiselinski sastav jetre kunića značajno se mijenja ovisno o spolu što upućuje za različitu regulaciju desaturacijskih i elongacijskih enzima kod muških i ženskih životinja. Najznačajnije razlike su u koncentracijama arahidonske kiseline i ukupnih dugolančanih n3 masnih kiselina. Ove razlike posebno upućuju na promjene u aktivnosti delta-5-desaturaze. Sve promjene primijećene u tkivu jetre ne postoje i u mišićnom tkivu. Budući je upravo mišićno tkivo jestivo, ove promjene nemaju bitan utjecaj na ukupnu kvalitetu mesa kunića. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se istražilo postoje li dodatne spolne razlike u metabolizmu masnih kiselina kunića u pojedinim patološkim stanjima poput nedostatka esencijalnih masnih kiselina.

6. Literatura

1. ALESSANDRI, J. M., A. EXTIER, K. H. AL-GUBORY, E. HARBEBY, M. S. LALLEMAND, A. LINARD, M. LAVIALLE, P. GUESNET (2012): Influence of gender on DHA synthesis: the response of rat liver to low dietary alpha-linolenic acid evidences higher omega3 4-desaturation index in females. European Journal of Nutrition 51, 199–209.
2. BURDGE, G. C., P. C. CALDER (2006): Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. Nutr. Res. Rev. 19, 26-52.
3. CHILDS, C. E., M. ROMEU-NADAL, G. C. BURDGE, P. C. CALDER (2010): The polyunsaturated fatty acid composition of hepatic and plasma lipids differ by both sex and dietary fat intake in rats. The Journal of Nutrition 140, 245–250.
4. COOK, H. W., R. C. MCMASTER (2002): Fatty acid desaturati on and chain elongation in eukaryotes. In: Biochemistry of lipids, lipoprotein and membranes. 4th ed. (Vance D.E., J.E. Vance Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp.181-204.
5. GILL, I., R. VALIVETY (1997): Polyunsaturated fatty acids, Part1: Occurrence, biological activities and applications. Trends. Biotechnol. 15, 401-409.
6. JUMP, D. B., S. TRIPATHY, C. M. DEPNER (2013): Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. Annual Review of Nutrition 33, 249–269.
7. KARLSON (1993): Biokemija pp. 234-250.
8. LUTKIĆ, A., JURIĆ, A. (2008): Biokemija pp. 163-175.
9. NELSON D. L., M. M. COX (2008): Lipids. In: Lehninger principles of biochemistry. 5th Edn. (Nelson, D.L., M.M. Cox, Eds.), W.H.Freeman, New York, pp. 805-824.
10. SPRECHER, H., Q. CHEN, F. Q. YIN (1999): Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n3: a complex intracellular process. Lipids 34, 153-156.
11. STARČEVIĆ, K., N. FILIPOVIĆ, M. SPERANDA, M. ĐIDARA, T. MAŠEK (2016): The influence of sex and gonadectomy on hepatic and brain fatty acid composition, lipogenesis and b-oxidation. Journal of animal physiology and animal nutrition, U tisku.
12. WILLIAMS, C. M. (2000): Dietary fatty acids and human health. Ann. Zootech. 49, 165-180.

7. Sažetak

UTJECAJ SPOLA NA MASNOKISELINSKI SASTAV TKIVA KUNIĆA

U istraživanju je korišteno 20 kunića kalifornijske pasmine podijeljenih po spolu. Cilj istraživanja je bio utvrditi postoje li razlike u metabolizmu masnih kiselina koje su ovisne o spolu. Sastav masnih kiselina određen je metodom plinske kromatografije. Rezultati su pokazali značajne razlike ovisno o spolu. Kod ženskih životinja su bile povišene koncentracije C17:0, C20:4n6, n3 LCPUFA i indeks za delta-5-desaturaciju. U mišićnom tkivu nisu primijećene razlike u sastavu masnih kiselina. Provedeno istraživanje potvrđuje pretpostavku kako je jetrena sinteza masnih kiselina različita ovisno o spolu kunića s jasnim povišenjem dugolančanih masnih kiselina kod ženki. Sve navedene promjene nisu vidljive u mišićnom tkivu pa možemo smatrati kako spolne razlike u sastavu masnih kiselina ne utječu na kvalitetu mesa.

Ključne riječi: kunić, spol, masne kiseline

8. Summary

INFLUENCE OF SEX ON FATTY ACID COMPOSITION OF RABBIT TISSUES

During the trial 20 Californian rabbits were used divided into two groups according to sex. Trial was performed to determine differences in fatty acid metabolism that are dependent on sex. Fatty acid composition was determined by gas chromatography. Results showed significant differences according to sex. Female rabbits had higher concentrations of C17:0, C20:4n6, n3 LCPUFA and delta-5-desaturation index. Fatty acid profile of muscle tissue was not statistically different between groups. Our trial confirms hypothesis that liver synthesis of fatty acids is dependent on sex and that the concentration of long chain fatty acids are higher in female rabbits. Changes observed in the liver are not observable in muscle tissue, therefore, it could be concluded that sex differences in fatty acid metabolism does not influence meat quality.

Key words: rabbit, sex, fatty acids

9. Životopis

Nelly Radić rođena je 27.02.1992. godine u Splitu. Završila je Osnovnu školu Majstora Radovana, 2007. godine te Opću gimnaziju Ivana Lucića 2010. godine u Trogiru. Fakultet veterinarske medicine upisuje u Zagrebu 2010. godine. Nakon 9. semestra opredjeljuje se za smjer male životinje (kućni ljubimci i egzote). Aktivno govori engleski jezik.