Metoda istraživanja brzine probave kemijskim markerima na životinjskim modelima

Marčina, Nives

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:772631

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODJSEK

METODA ISTRAŽIVANJA BRZINE PROBAVE KEMIJSKIM MARKERIMA NA ŽIVOTINJSKIM MODELIMA

(METHODS FOR DIGESTION RATE STUDIES USING CHEMICAL MARKERS ON ANIMAL MODELS)

SEMINARSKI RAD

Nives Marčina
Preddiplomski studij znanosti o okolišu
(Undergraduate Study of Environmental Sciences)
Mentor: doc. dr. sc. Duje Lisičić
Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. PROBAVNI SUSTAV I FIZIOLOGIJA PROBAVE 2
2.1. Specijalizacije biljojeda 3
3. METODE ISTRAŽIVANJA BRZINE PROBAVE 6
3.1. Kemijski markeri u istraživanju brzine probave 6
4. ZAKLJUČAK 8
5. LITERATURA 9
6. SAŽETAK 10
7. SUMMARY 10

1. UVOD

Precizno mjerenje stope tranzita i stope retencije probave važno je za razumijevanje odnosa prehrane i fiziologije probavila (Sakaguchi, 2007).

Životinje hranjenjem unose materijal iz okoline u organizam. Taj se materijal sastoji od topivih i netopivih spojeva. Nutrijenti su molekule koje omogućavaju životinjama izgradnju i održavanje stanica. Osnovni način uzimanja nutrijenata iz okoline je putem ingestije, a nutrijenti se onda apsorbiraju u probavnom sustavu. Neki od nutrijenata služe životinjama za dobivanje energije, dok drugi služe kao građevni blokovi. Esencijlni nutrijenti su tvari koje životinje moraju unositi prehranom, a neesencijalne nutrijente mogu proizvesti u organizmu iz drugih molekula (Moyes i Schulte, 2006).

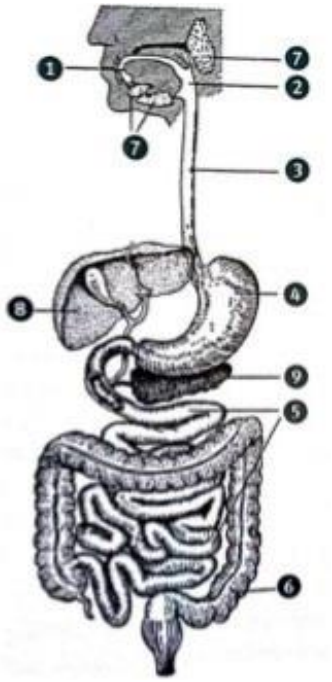
Prema osnovnim prehrambenim strategijama životinje se mogu podijeliti na mesojede, biljojede i svejede. Fiziologija probave povezana je s kemijskom i fizikalnom prirodom prehrane. Najjednostavnije životinje imaju neprohodno probavilo (hrana se unosi na istom otvoru kroz koji se izbacuju neprobavljeni ostatci), dok složenije životinje razvijaju prohodno probavilo i povećavaju površinu probavila kako bi povećale učinak probave. Uvođenje odjeljaka s različitim funkcijama unutar probavila također povećava učinkovitost probave. Životinje s različitim prehrambenim strategijama imaju različitu građu probavila. Biljojedi pokazuju veću složenost građe jer životinje ne mogu razgraditi biljna vlakna (celulozu) pa moraju razviti dodatne odjeljke u kojima se odvija mikrobiološka razgradnja (Moyes i Schulte, 2006).

Mjerenje brzine probave može se postići praćenjem markera koji zajedno s ostalom hranom prolazi kroz probavilo. Za svako mjerenje potrebno je odabrati odgovarajući marker od mnogo različitih vrsta markera (Sakaguchi, 2007). Kod biljojeda se probava najčešće dijeli na krutu i tekuću frakciju pa je za najbolje rezultate potrebno mjeriti obje frakcije odgovarajućim markerima (Uden i sur., 1980).

2. PROBAVNI SUSTAV I FIZIOLOGIJA PROBAVE

Probava obuhvaća sve procese koji pridonose fizikalnoj i kemijskoj razgradnji hrane. Prvi korak je pronalaženje hrane, u kojem sudjeluje osjetni sustav (primjerice antene kod kukaca). Kada je hrana pronađena, slijedi hvatanje hrane korištenjem za to specijaliziranih dijelova tijela (primjerice kliješta kod rakova). Nakon toga, dolazi do mehaničke obrade hrane pomoću specijaliziranih struktura kao što su npr. zubi kod sisavaca. Naposlijetku dolazi do kemijske razgradnje hrane, to jest do razgradnje hrane na makromolekule ili na male molekule te apsorpcije nutrijenata što se najčešće odvija izvan stanice, u za to specijaliziranom probavnom sustavu. Nakon kemijske razgradnje, neprobavljivi ostatci hrane izbacuju se iz tijela (Moyes i Schulte, 2006).

Fiziologija probave ovisi o kemijskoj i fizikalnoj prirodi prehrane, a izbor hrane ovisi o potrebama životinja. Evolucijski razvoj probavnog sustava obilježen je brojnim anatomskim i funkcionalnim specijalizacijama. Usložavanje probavnog sustava omogućava bolje iskorištavanje hrane (Moyes i Schulte, 2006). Probavni sustav kralješnjaka sastoji se od probavne cijevi i organa koji su joj pridodani, npr. žlijezde jetra i gušterača. Probavna cijev dijeli se na usnu šupljinu, ždrijelo, jednjak, želudac, tanko i debelo crijevo, rektum i anus (Slika 1). Svaki dio probavne cijevi ima specifičnu građu (Kozarić, 1997). Iako je opći plan građe probavne cijevi sličan, svojte kralješnjaka razlikuju se u tipovima odjeljaka. Mnogi sisavci posjeduju modifikacije duž probavne cijevi koje poboljšavaju probavljivost biljnog materijala. Žlijezde i razni tipovi stanica u probavnom sustavu pomažu u probavi tako što luče različite tvari: kiseline ili baze, sluz, vodu te probavne enzime. Specijalizirane stanice duž probavne cijevi služe za apsorpciju i transport određenih hranjivih tvari. Probava započinje u usnoj šupljini, gdje se hrana zubima mehanički usitnjava, a žlijezde slinovnice luče vodu i probavne enzime koji omekšavaju hranu i započinju razgradnju ugljikohidrata. Hrana se zatim ždrijelom prenosi do želuca gdje se nastavlja enzimska razgradnja kojoj pridonosi pH u želucu. Kemijska razgradnja hrane dovršava se u dvanaesniku (početak tankog crijeva) uz pomoć enzima iz jetre i gušterače, a u ostatku crijeva se apsorbira većina nutrijenata. Biljojedi često imaju dodatne odjeljke koji služe za fermentaciju hrane i sadrže endosimbiontske bakterije koje pomažu u razgradnji biljnog materijala. Apsorbirane hranjive tvari mogu se koristiti za dobivanje energije ili se mogu pohranjivati u za to specijaliziranim tkivima i organima (Moyes i Schulte, 2006).



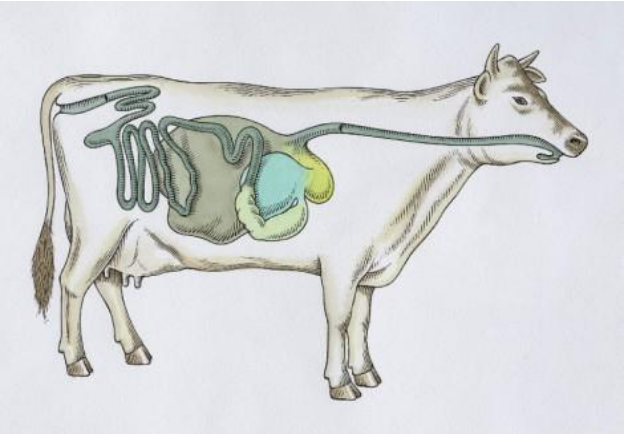
Slika 1. shema probavnog sustava kralješnjaka (na primjeru čovjeka): 1 – usna šupljina, 2 – ždrijelo, 3 – jednjak, 4 – želudac, 5 – tanko crijevo, 6 – debelo crijevo, 7 – žlijezde slinovnice, 8 – jetra, 9 – gušterača.
(izvor: image.slidesharecdn.com)

Prehrambene strategije životinja imaju svrhu osiguravanja svih potrebnih nutrijenata minimizirajući rizike za preživljavanje. Najvažnije varijable u pogledu fiziologije probave su priroda nutrijenata, količina konzumirane hrane i učestalost konzumiranja hrane. Životinje moraju prilagoditi unos hrane tako da zadovolje trenutne metaboličke potrebe, ali i osiguraju mogućnost dugotrajnog razvoja i reprodukcije (Moyes i Schulte, 2006).

2.1. Specijalizacije biljojeda

Biljojedi imaju specijalizirane zube kojima mogu probiti stanične stijene biljaka i tako osloboditi sadržaj stanica, ali samo posebni enzimi mogu razgraditi celulozu koja izgrađuje stanične stijenke i pretstavlja velik dio biljnog materijala. Nijedna višestanična životinja ne može sintetizirati enzime potrebne za razgradnju celuloze pa se biljojedi oslanjaju na mikroorganizme koji žive u njihovom probavnom sustavu i produciraju potrebne enzime. Iako svi sisavci imaju neku vrstu simbiontskih mikroorganizama u probavilu, jedino biljojedi imaju posebno razvijene odjeljke u kojima žive mikroorganizmi koji pretvaraju celulozu i lignin iz staničnih stijenki u probavljive hranjive tvari (Pough i sur., 2009).

Postoje različiti oblici fermentacijske probave koji rješavaju problem korištenja biljaka kao hrane. Konji i ostali neparnoprstaši imaju fermantaciju u stražnjem dijelu probavila, što znači da imaju jednostavan želudac, dok su im debelo crijevo i cekum povećani i služe kao odjeljci za fermentaciju. Još neki primjeri ovog tipa fermentacije su slonovi, koale, zečevi i mnogi glodavci. Određeni stupanj fermentacije u stražnjem dijelu probavila moguće je primitivno svojstvo kralješnjaka jer ga je moguće pronaći među pticama, gušterima, kornjačama i ribama, pa čak i kod sisavaca koji su mesojedi ili svejedi. Krave i ostali prežvači primjer su fermentacije u prednjem dijelu probavila, odnosno imaju prednji želudac podijeljen u tri odjeljka unutar kojih se pohranjuje i fermentira hrana, i četvrti odjeljak u kojem se odvija probava (Slika 2). Jednostavniji oblik fermentacije u prednjem dijelu probavila, gdje nema podjele želuca ni preživanja, može se pronaći kod mnogo drugih sisavaca poput klokana i nekih glodavaca. Simbionti u probavilu su karakteristični za svaku skupinu životinja, nevezano za njihovu filogenetsku pripadnost (Pough i sur., 2009).



Slika 2. Shema probavnog sustava kod krave (fermentacija u prednjem dijelu probavila).
(izvor: www.medioteka.hr)

Životinje koje imaju fermentaciju u stražnjem dijelu probavila dobro žvaču hranu da bi zubima probili stanične stijenke biljaka i oslobodili sadržaj stanica. Sadržaj stanica se probavlja i apsorbira u želucu i tankom crijevu, a celuloza iz staničnih stijenki ostaje netaknuta dok ne dođe do cekuma i debelog crijeva gdje ju razgrađuju simbiontski mikroorganizmi. Produkti fermentacije su hlapljive masne kiseline koje se apsorbiraju kroz stijenke probavila. Neke male životinje s ovim tipom fermentacije (npr. zečevi i glodavci) ne apsorbiraju prve produkte fermentacije, nego se oslanjaju na koprofagiju da bi reciklirali nutrijente (Pough i sur., 2009).

Preživači ne trebaju tako dobro žvakati hranu jer se stanične stijenke razgrađuju u želucu, a omekšana hrana se vraća u usta i ponovno je žvaču. U prva dva želuca odvija se mikrobiološka razgradnja celuloze, a hrana se vraća u usta sve dok čestice ne postanu dovoljno male da prođu dalje u probavilo. Većina celuloze se razgradi i apsorbira prije nego hrana dođe do zadnjeg želuca, a proces probave od te točke je kao i kod većine sisavaca (Pough i sur., 2009).

3. METODE ISTRAŽIVANJA BRZINE PROBAVE

Brzina probave može se izraziti kao vrijeme tranzita i vrijeme retencije. Vrijeme tranzita predstavlja interval između unošenja markera u životinju (hranjenjem ili injekcijom) i njegove pojave u pojedinom dijelu probavnog sustava. Vremenom retencije mjeri se koliko se pojedini dio probave zadržava u probavilu. S obzirom da se u različitim dijelovima probave odvijaju različiti procesi, vrijeme retencije dijelova probave može biti različito (Sakaguchi, 2007).

Markeri su referentni spojevi koji se koriste za monitoring kemijskih i fizikalnih aspekata probave. Bez markera ti se parametri mogu mjeriti invazivnim metodama. Markeri minimaliziraju utjecaj istraživanja na ponašanje životinje. Načini doziranja markera i prikupljanja uzoraka mogu biti različiti. Doziranje može biti jednokratno, pulsno ili kontinuirano, o tome ovisi prikupljanje uzoraka (Owens, 1992).

Markeri se također mogu definirati kao neprobavljive tvari koje služe za obilježavanje hrane, a mogu se identificirati u fecesu. Može ih se klasificirati u tri kategorije: elemente, spojeve i partikulate (fizikalne markere). Spojevi se dalje mog podijeliti na vanjske i unutarnje markere, gdje vanjski predstavljaju umjetne tvari koje se daju životinjama, a unutarnji su neprobavljive tvari koje su sastavni dio hrane (Kotb i Luckey, 1972).

Izbor markera ovisi o frakciji probave koju želimo mjeriti. Kod životinja koje imaju fermentaciju, probava se može podijeliti na krutu i tekuću frakciju, a za najbolje rezultate poželjno je mjeriti brzinu za obje frakcije. U mjerenju krute frakcije mogu poslužiti primjerice partikulati, a za mjerenje tekuće fakcije mogu se koristiti spojevi (Uden i sur., 1980).

3.1. Kemijski markeri u istraživanju brzine probave

Kemijske metode istraživanja brzine probave oslanjaju se na kemijske spojeve kao markere. Oni mogu služiti u mjerenju krute, ali i tekuće frakcije, iako kruti markeri daju lošije rezultate od tekućih (Uden i sur., 1980).

Boje se koriste za istraživanje brzine probave od 1920-ih, ali ne postoje uspješne metode za kvantificiranje boja u fecesu, osim u slučaju antrakinon ljubičaste. Daljnji problem s korištenjem boja za označavanje hrane je u tome što se boje apsorbiraju u probavnom traktu (Uden i sur., 1980).

Kao kruti markeri mogu poslužiti primjerice bizmutove soli jer slabo reagiraju s krutom frakcijom probave te mogu zamijeniti fizikalne markere poput gume, staklenih perlica

ili komadića plastike. Problem s ovom vrstom markera je u tome što mogu poslužiti samo za mjerenje relativne brzine probave, a ponekad ih je teško kvantificirati (Uden i sur., 1980).

Za istraživanje brzine probave tekuće frakcije mogu se koristiti spojevi poput polietilen-glikola (PEG) ili krom-etilendiamintetraoctene kiseline (Cr-EDTA). Metalni atomi mogu se koristiti u stabilnim kompleksima s biljnim vlaknima jer je metalne atome lakše kvantificirati u fecesu od organskih spojeva. Za obilježavanje staničnih stijenki mogu također poslužiti ^{14}C izotopi ugljika. Obilježavanje se postiže uzgajanjem biljaka u okolišu s plinovitim $^{14}CO_2$. Glavni ograničavajući faktor za korištenje ove metode je količina truda kojeg je potrebno uložiti za dobivanje preciznih rezultata (Uden i sur., 1980).

Cr-EDTA i Co-EDTA daju dobre rezultate u mjerenju tekuće frakcije probave. Ovi kompleksi su stabilni u uvjetima koji vladaju u probavilu životinja i pronalaze se u velikom postotku (Uden i sur., 1980). Ovi se spojevi, uz stanične stijenke obilježene metalnim ionima, mogu koristiti za izračunavanje vremena retencije tekuće frakcije u rumenu ili cekumu životinja (Pei i sur., 2001).

Co-EDTA (Slika 3) može se pripremiti kao litijeva ili natrijeva sol Co(III)-EDTA. Stanične stijenke mogu se pripremiti tako što se biljni materijal prvo tretira s detrdžentom (po potrebi i s amilazom, ako je u biljci veći udio škroba) kako bi se uklonili topivi materijali koji bi mogli reagirati s metalima. Nakon dobrog ispiranja, pripremljena biljna vlakna se mogu obilježi kromom (Uden i sur., 1980). Markere se zatim može dati životinjama u komadiću hrane (npr.jabuke), a nakon što ih životinje unesu u organizam, slijedi skupljanje fecesa u određenim periodima. Za detekciju markera u fecesu mogu poslužiti metode poput plamene apsorpcijske spektroskopije. Brzina probave se zatim iz dobivenih rezultata računa statistički (Pei i sur., 2001).



Slika 3. Priprema kobalt-etildiamintetraoctene kiseline (Co-EDTA).

(slika: Marčina N.)

4. ZAKLJUČAK

Istraživanje brzine probave važno je za razumijevanje odnosa prehrane i fiziologije probave životinja. Životinje mogu imati različite prehrambene strategije te različite izbore pri hranjenju te kao poslijedicu toga različitu građu i fiziologiju probavnog sustava. Iako je probavni sustav kompleksan i ima brojne funkcije, on podliježe sličnoj građevnoj shemi kod svih kralješnjaka. Sastoji se od probavne cijevi koja je više ili manje podijeljena u odjeljke od kojih svaki ima određenu funkciju u probavi unesene hrane. Biljojedi imaju složeniju podjelu na odjeljke, odnosno imaju posebne odjeljke u kojima se odvija mikrobiološka razgradnja biljnih vlakana koja su životinjama neprobavljiva, a probava im se može podijeliti na krutu frakciju koja brže prolazi kroz probavilo i na tekuću frakciju koja se zasržava u odjeljcima za fermentaciju.

Markeri su važni za istraživanje brzine probave jer zamijenjuju invazivne metode i tako umanjuju utjecaj istraživanja na ponašanje životinja. To su inertne tvari kojima se obilježava hrana ili se daju životinji, a mogu se detektirati u fecesu. Markeri se mogu podijeliti na elemente, spojeve i partikulate, a spojevi se dijele na unutrašnje i vanjske markere.

U kemijskim metodama istraživanja brzine probave koriste se kemijski spojevi kao markeri. Njima se mogu obilježiti dijelovi biljaka ili se mogu dati životinji samostalno, a dijele se na krute i tekuće markere, od kojih svaka skupina služi za obilježavanje pojedine frakcije probave. Pravilan izbor markera od iznimne je važnosti za rezultate istraživanja. Kod životinja koje imaju podjelu probave na frakcije potrebno je mjeriti obje frakcije, što se postiže upotrebom odgovarajućih markera. Kruta frakcija može se mjeriti upotrebom fizikalnih markera poput staklenih perlica i komadića plastike ili kemijskim markerima poput bizmutovih soli. Za mjerenje tekuće frakcije koriste se kemijski markeri koji mogu biti samostalni spojevi, npr. Co-EDTA ili se biljni materijal (stanične stijenke) može obilježiti atomima metala, npr. kroma. Nakon što je životinja unijela marker u probavu, potrebno je prikupljati feces i u njemu detektirati markere. Na kraju se brzina probave računa statistički.

5. LITERATURA

image.slidesharecdn.com

Kotb A., Luckey T. (1972): Markers in Nutrition. The Commonwealth Bureau of Nutrition – Nutrition Abstracts and Reviews. 42 (3), 813-845

Kozarić Z. (1997): Probavni sustav U: Veterinarska histologija. Naklada Karolina, Zagreb, str.149-168

Moyes C.D., Schulte P.M. (2006): Digestion U: Principles of Animal Physiology, 1. izd., Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, San Francisco, SAD. str. 502-545

Owens F.N., Hanson C.F. (1992): External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. Journal of Dairy Science. 75 (9), 2605-2617

Pei Y.X., Wang D.H., Hume I.D. (2001): Selective digesta retention and coprophagy in Brandt's vole (*Microtus brandti*). Journal of Comparative Physiology B. 171 (6), 457-464

Pough F.H., Janis C.M., Heiser J.B. (2009): Mammalian specializations U: Vertebrate Life, 8. izd., Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, SAD. str. 553-579

Sakaguchi E. (2007): Measurements of Digesta Transit and Retention Time in the Gut. Foods Food Ingredients J. Jpn. 212 (1), 8530

Udén P., Colucci P.E., Van Soest P. (1980): Investigation of Chromium, Cerium and Cobalt as Markers in Digesta. Rate of Passage Studies. J. Sci. Food Agric. 31, 625-632

www.medioteka.hr

6. SAŽETAK

Istraživanje brzine probave važno je za razumijevanje odnosa prehrane i fiziologije probave. Ovisno o prehrambenim strategijama, životinje mogu imati različitu građu probavnog sustava i fiziologiju probave. Kod biljojeda se probava može podijeliti na krutu i tekuću frakciju. Markeri su referentni spojevi koji se koriste u istraživanju brzine probave za obilježavanje i mjerenje pojedine frakcije. Dijele se na fizikalne (partikulati) i kemijske (elementi i spojevi) markere, a kemijski se dalje dijele na unutarnje i vanjske. U kemijskim metodama koriste se kemijski markeri koji mogu obilježavati krutu ili tekuću frakciju. Za mjerenje brzine probave tekuće frakcije mogu se koristiti Co-EDTA i stanične stijenke obilježene kromom.

7. SUMMARY

Digestion rate studies are important for understanding the relationship between nutrition and the physiology of digestion. Depending on dietary strategies, animals may have different gut morphology and different physiology of digestion. In herbivores digestion can be devided in particulate and liquid fraction. Markers are referent compounds which can be used in digestion rate studies to mark and measure either fraction. They can be divided in physical (particulates) and chemical (elements and compounds) markers and chemical markers can further be divided in inherent and external markers. Chemical methods use chemical markers to mark either particulate or liquid fraction. Co-EDTA and chromium mordanted cell walls can be used to measure digestion rate for liquid fraction.