

# MASNE KISELINE FOSFOLIPIDA SERUMA KAO BIOMARKERI HRANIDBENOGA STATUSA U POPULACIJI MUFLONA: UTJECAJ DOBI I SPOLA



## Fatty acids of serum phospholipids as biomarkers of nutritional status in mouflon population: influence of age and gender

T. Mašek, K. Gnjiđić, M. Šperanda, D. Brozić, K. Starčević

### Sažetak

Cilj istraživanja bila je optimizacija metode za utvrđivanje masnokiselinskoga sastava fosfolipida seruma. Istraživanje je provedeno na populaciji od 40 muflona podijeljenih prema dobi na tri skupine (mlađi od dvije godine, između dvije i tri godine i stariji od tri godine) te prema spolu. Nakon izolacije ukupni lipidi razdvojeni su primjenom tankoslojne kromatografije na polarne (fosfolipidi) i neutralne. Nakon razdvajanja fosfolipidi su transesterificirani u oblik metilnih estera masnih kiselina i analizirani metodom plinske kromatografije. Dobiveni rezultati pokazali su značajan utjecaj dobi na koncentraciju pojedinih masnih kiselina i zbirni profil. Nasuprot tomu, spol nije značajnije utjecao na koncentraciju masnih kiselina. Rezultati su potvrdili kako je riječ o primjenjivoj i relativno jednostavnoj metodi. Takva metoda može imati široki raspon primjene, od procjene hranidbenoga statusa i okoliša divljih životinja do kontrole i prevencije prekomjerne tjelesne mase, metaboličkoga sindroma i šećerne bolesti kod kućnih ljubimaca.

**Ključne riječi:** masne kiseline, fosfolipidi, serum, plinska kromatografija, tankoslojna kromatografija.

### Abstract

The aim of the investigation was optimization of the method for determination of fatty acid composition of serum phospholipids. The study was conducted on a population of 40 mouflon divided into three age groups (under two years, between two and three years and older than three years) and into male and female group. After isolation, total lipids were separated using thin layer chromatography into polar (phospholipids) and neutral lipids. After the separation, phospholipids were transesterified and analyzed by gas chromatography in the form of fatty acid methyl esters. The results showed a significant effect of age on the concentration of individual fatty acids and on the summarized profile. In contrast, gender did not influence the concentration of fatty acids. Results have confirmed that described method is applicable and relatively simple for routine analyses. The method can have a wide range of applications, from the assessment of wildlife nutritional status to the control and prevention of obesity, metabolic syndrome and diabetes in pets.

**Key words:** fatty acids, phospholipids, serum, gas chromatography, thin layer chromatography.

### Uvod

Kod svih životinja i čovjeka masne kiseline potječu iz triju izvora: hrane, *de novo* sinteze u organizmu i biokonverzije. Masne kiseline koje ne mogu nastati *de novo* sintezom, alfa-linolenska (C18:3n3) i linolna

(C18:2n6), nazivamo esencijalnim masnim kiselinama. U organizmu one pomažu pravilnomu radu stanica i organa, a od njih nastaju spojevi koji utječu na široki spektar bioloških funkcija (krvni tlak, zgrušavanje krvi, koncentracija lipida u krvi, imunološki odgo-

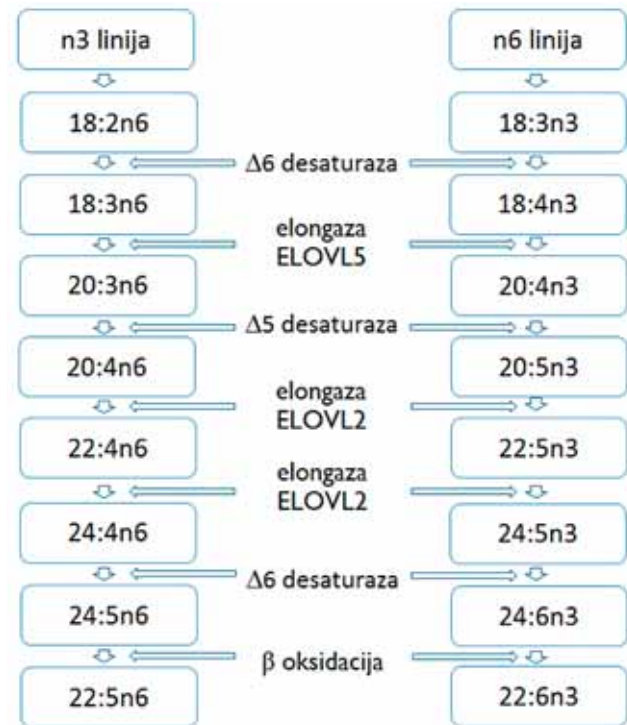
Tomislav MAŠEK, dr. med. vet., docent, Katrin GNJIĐIĆ, dr. med. vet., Veterinarski fakultet, Zagreb; Marcela ŠPERANDA, dr. med. vet., redoviti profesor, Poljoprivredni fakultet, Osijek; Diana BROZIĆ, dr. med. vet., Kristina STARČEVIĆ, dipl. ing. kem. teh., znanstveni suradnik, Veterinarski fakultet, Zagreb.

vor). Esencijalne masne kiseline moraju biti unesene u organizam hranom, pri čemu se stvaraju nizovi n6 i n3 masnih kiselina. Biokonverzija n3 masnih kiselina uključuje desaturaciju s pomoću delta 6 desaturaze, produženje lanca elongazama i desaturaciju delta 5 desaturazom, nakon čega nastaje eikozapentaenska kiselina (C20:5n3). Nastajanje zadnjega metabolita, dokozaheksaenske kiseline (C22:6n3), uključuje beta oksidaciju u peroksisomima. Metabolički put n6 masnih kiselina uključuje iste enzime kao i n3 put, ali je početna masna kiselina linolna i krajnji metabolit arahidonska (C20:4n6). Masne kiseline n3 i n6 linije preteče su eikozanoida (prostaglandini, tromboksani i leukotrieni). Eikozanoidi dobiveni od n6 linije imaju značajno različite metaboličke učinke u odnosu na n3 liniju. Između n3 i n6 linije također postoji kompeticija za enzime uključene u desaturaciju i elongaciju (She-ma 1.) (Williams, 2000.).

Pri uporabi masnih kiselina kao biomarkera potrebno je utvrditi i nehranidbene čimbenike koji mogu utjecati na rezultate. U ovom radu istraženi su učinci spola, odnosno spolnih hormona i dobi životinje. Dosadašnja istraživanja potvrdila su kako spolni hormoni značajno utječu na metabolizam masnih kiselina. Koncentracije progesterona i estrogena povezane su s višim koncentracijama PUFA (Childs et al., 2008.), dok testosteron smanjuje aktivnost  $\Delta 5$  i  $\Delta 6$  desaturaze (Mara and Alaniz, 1989., Clejan et al., 1982., Cinci et al., 2000.). Učinak dobi manje je proučavan, ali je dokazan kod domaćih i divljih životinja (Cygan-Szczygielniak i Janicki, 2011.).

Masne kiseline fosfolipida utječu na stanicu i unutarstanične procese te su nužne za razvoj vitalnih organa poput mrežnice i mozga (Simopoulos, 1994.). Masnokiselinski sastav lipida seruma, osobito fosfolipida, reflektira masnokiselinski sastav staničnih membrana (Dougherty i sur., 1987.), koji je važan čimbenik u interakciji obroka i osjetljivosti na inzulin (Storlien i sur., 1996.).

Cilj istraživanja bio je potvrđivanje modela masnih kiselina kao biomarkera unosa pojedinih komponenata hrane i definiranje nehranidbenih čimbenika koji mogu utjecati na masnokiselinski sastav fosfolipida seruma. Metoda ima primjenu kod divljih životinja u procjeni hranidbenoga statusa i kvalitete okoliša i kod kućnih ljubimaca pri dijagnosticiranju i praćenju uspješnosti liječenja prekomjerne tjelesne mase, metaboličkoga sidroma i šećerne bolesti.



Shema 1. Metabolički putevi n3 i n6 linija masnih kiselina s prikazanim zajedničkim enzimima desaturacije i elongacije (na shemi nisu prikazani eikozanoidi kao produkti 20:4n6 i 20:5n3 te neuroprotektini i rezolvinoli kao produkti 22:6n3)

## Materijal i metode

Istraživanje je provedeno na 40 muflona podijeljenih prema dobi na tri skupine (mlađi od dvije godine, između dvije i tri godine i stariji od tri godine) te prema spolu. Uzorci krvi dobiveni su punkcijom jugularne vene. Krv je centrifugirana i dobiveni serum pohranjen je na - 20 °C. Ukupni lipidi izdvojeni su iz seruma uporabom mješavine heksan/isopropanol u omjeru 3 : 2 (Hara i Radin, 1978.). Sve otopine sadržavale su 0,005% butilhidroksitoluena kako bi se spriječila oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA). Nakon razdvajanja slojeva odvojen je gornji sloj koji sadrži ukupne lipide otopljene u heksanu. Nakon uparavanja heksana na rotavaporu dio ukupnih lipida nanesen je na silica gel G preparativnu ploču 20×20 cm (500 μm, Uniplate, Analtech, Inc., USA) za tankoslojnu kromatografiju (TLC). Kao mobilna faza za razvijanje TLC ploče upotrijebljen je heksan/eter/octena kiselina u omjeru 60 : 40 : 1. Lipidi su vizualizirani reverzibilnom adicijom para joda. Dio lipida za koje je primjenom standarda utvrđeno da pripadaju fosfolipidima sastrugan je s TLC ploče i ekstrahiran s metanolom. Metilni esteri masnih kiselina fosfolipida pripremljeni su metilacijom s 20% otopinom BCl<sub>3</sub> u metanolu (Rule, 1997.). Nakon ekstrakcije metiliranih masnih kiselina u heksanu odvojen je dio od 500

μl i preseljen u viala za plinsku kromatografiju. Tako pripremljeni uzorci analizirani su metodom plinske kromatografije FID detektorom (Gas Chromatograph GC 2010 Plus, Shimadzu, Japan). Za analizu upotrijebljena je kolona ZBWAX (Phenomenex, USA) s helijem kao nosačem. Kvantifikacija masnih kiselina provedena je normalizacijom površina nakon identifikacije s pomoću eksternoga standarda (37 component FAME mix, PUFA No3, Sigma-Aldrich, Germany).

Statističke analize obavljene s pomoću statističkoga programa Statistica (Statistica, Version 9). Distribucija je testirana Shapiro Wilks testom, a značajnost razlika analizom varijance.

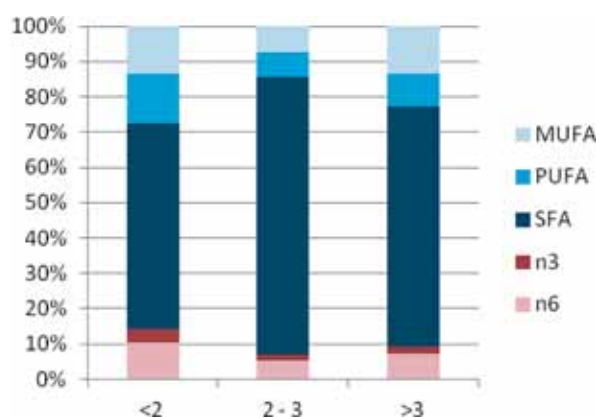
## Rezultati i rasprava

Najzastupljenija masna kiselina u fosfolipidima seruma bila je stearinska, zatim palmitinska, oleinska i arahidonska kiselina. Dobiveni rezultati pokazali su da dob životinja značajno utječe na koncentraciju pojedinih masnih kiselina. Kako se povećava dob životinja, uočava se trend smanjenja koncentracije linolne, linolenske, arahidonske i dokozaheksaenske te porast koncentracije palmitinske kiseline (Tablica 1.). Također, i u skupnom profilu masnih kiselina uočen je pad n6, n3 i PUFA u starijih životinja (Grafikon 1.). Spol nije značajno utjecao na koncentraciju pojedinih masnih kiselina ni na zbirni sastav masnih kiselina fosfolipida (Grafikon 2.).

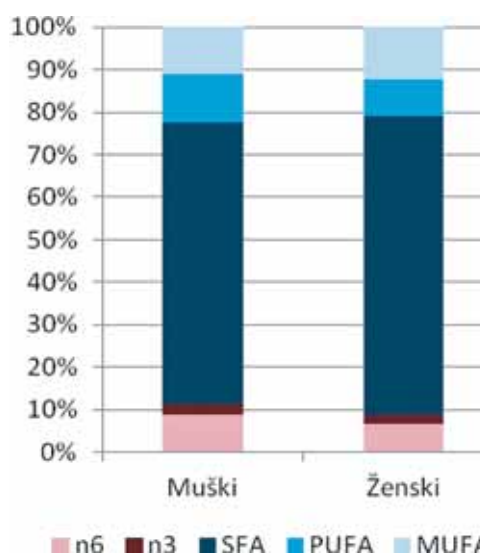
Tablica 1. Utjecaj dobi na koncentraciju masnih kiselina u fosfolipidima seruma muflona

Masna kiselina	Dobne skupine		
	< 2 (n = 12)	2 - 3 (n = 14)	> 3 (n = 12)
C16:0 (palmitinska)	25,41 <sup>a</sup>	33,96 <sup>ab</sup>	38,23 <sup>b</sup>
C18:0 (stearinska)	42,59 <sup>a</sup>	50,59 <sup>b</sup>	36,79 <sup>a</sup>
C18:1n9 (oleinska)	14,67 <sup>a</sup>	7,76 <sup>b</sup>	14,44 <sup>a</sup>
C18:2n6 (linolna)	8,48 <sup>a</sup>	5,34 <sup>b</sup>	6,25 <sup>ab</sup>
C18:3n3 (alfa linolenska)	1,40 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,71 <sup>b</sup>
C20:1n9 (eikozenska)	0,82 <sup>a</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>
C20:4n6 (arahidonska)	2,53 <sup>a</sup>	0,98 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>
C20:3n6 (dihomo gama linolenska)	0,56 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	1,21 <sup>a</sup>
C20:5n3 (eikozapentaenska)	0,36 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>
C22:5n6 (dokozaapentaenska n6)	0,34 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,35 <sup>a</sup>
C22:5n3 (dokozaapentaenska n3)	2,09 <sup>a</sup>	0,67 <sup>b</sup>	0,72 <sup>b</sup>
C22:6n3 (dokozaheksaenska)	0,74 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,40 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup>Vrijednosti označene različitim superskriptima u istom retku značajno se razlikuju, p < 0,01



Grafikon 1. Utjecaj dobi na zbirni sastav masnih kiselina fosfolipida seruma muflona



Grafikon 2. Utjecaj spola na zbirni sastav masnih kiselina fosfolipida seruma muflona



Utjecaj spola na razinu masnih kiselina utvrđen je uglavnom kod čovjeka i štakora (Marra i Alaniz, 1989., Burdge i Wootton, 2002.), a razlog je tomu najvjerojatnije utjecaj spolnih hormona na metabolizam jedinke. Koncentracija dugolančanih PUFA u serumu i tkivima u pozitivnoj je korelaciji s cirkulirajućim razinama estradiola i progesterona te u negativnoj korelaciji s razinom testosterona (Childs i sur., 2008.). Istodobno aplikacija testosterona kod štakora značajno smanjuje aktivnost  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  desaturaze (Marra i Alaniz, 1989., Cinci i sur., 2000.). Osim izravnoga učinka spolnih hormona na desaturacijsku aktivnost, primijećeno je da je razina  $\beta$ -oksidacije viša u muškaraca negoli u žena. Posljedica je tih spolnih razlika veća dostupnost 18:3n3 za daljnju biokonverziju u PUFA s većim brojem ugljikovih atoma. Takav utjecaj spola nije bio vidljiv u našem istraživanju. Ipak, potreban je oprez pri uspoređivanju tih istraživanja jer se ne mogu zanemariti ostali čimbenici koji posredno ili neposredno mogu utjecati na koncentraciju masnih kiselina poput gravidnosti, prehrambenih navika ili ukupne količine masti kod pojedinih životinja.

Naše istraživanje pokazalo je promjene u sastavu masnih kiselina ovisne o dobi. Porast zasićenih masnih kiselina kod starijih životinja u skladu je s ostalim studijama koje su istraživale divlje ili farmske preživaače (Clemens i sur., 1974., Purchas i sur., 2010., Triumph i sur., 2012.). Pad koncentracije PUFA može neizravno upućivati na promjene u desaturacijskoj aktivnosti glede pada aktivnosti  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  desaturaze. Posljedica pada aktivnosti tih enzima može biti i pad koncentracije dugolančanih PUFA. Takav zaključak potvrđen je u istraživanju na štakorima, gdje je proučavana aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze i masnokiselinski sastav mikrosomalnih lipida kod životinja različite dobi (Bordoni i sur., 1988.). Aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze značajno se smanjila kod starijih životinja s linearnom korelacijom između aktivnosti  $\Delta 6$  desaturaze i dobi životinje. Masnokiselinski sastav lipida pratio je te promjene aktivnosti  $\Delta 6$  desaturaze ovisne o dobi. Glavna je promjena bila u koncentraciji 20:4n6, koja se značajno smanjila usporedno s padom aktivnosti  $\Delta 6$  desaturaze. Međutim, razina masnih kiselina ne mora uvijek odražavati ekspresiju desaturacijskih enzima (Tu i sur., 2010.). Razlog je veoma složen mehanizam kontrole biokonverzije dugolančanih PUFA, koji uključuje, osim ekspresije desaturacijskih enzima, i konkurenciju n3 i n6 linija za iste enzime, konkurenciju unutar same n3 linije, konkurenciju za supstrat, spolne hormone, glukokortikoide, inzulin, transkripcijske faktore poput PPAR $\gamma$  i SREBP-1c i vjerojatno još neotkrivene čimbenike i interakcije (Tu i sur., 2010.).

Unatoč utjecaju dobi na rezultate, prehrana životinja još je uvijek najznačajniji čimbenik koji određuje masnokiselinski sastav lipida. Masne kiseline seruma

time postaju zanimljiv biomarker unosa pojedinih komponenata hrane i kvalitete prehrane. Primjerice, masne kiseline kao indikatori metabolizma glukoze povezane su s unosom oleinske i  $\alpha$  linolenske kiseline (Louheranta i sur., 2002.). Takvi rezultati upućuju na činjenicu da masne kiseline značajno utječu na metabolizam glukoze te ističu važnost masnokiselinskoga sastava u prevenciji i tretmanu poremećaja metabolizma glukoze. Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da je određivanje masnokiselinskoga sastava fosfolipida seruma jednostavna metoda, koja može imati široku primjenu u veterinarskoj medicini i uzgoju životinja te u praćenju hranidbenoga statusa i kvalitete staništa divljih životinja.

## LITERATURA

1. BORDONI, A., P. L. BIAGI, E. TURCHETTO, S. HRELIA (1988): Aging influence on delta-6-desaturase activity and fatty acid composition of rat liver microsomes. *Biochem. Int.* 17, 1001-1009.
2. BURDGE, G. C., S. A. WOOTTON (2002): Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.* 88, 411-420.
3. CHILDS, C.E., M. ROMEU-NADAL, G. C. BURDGE (2008): Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 19-27.
4. CINCI, G., R. GUERRANTI, R. PAGANI, F. CARLUCCI, L. TERZUOLI, F. ROSI, E. MARINELLO (2000): Fatty acid composition of phospholipids, triglycerides and cholesterol in serum of castrated and estradiol treated rats. *Life Science* 66, 1647-1654.
5. CLEMENS, E., V. ARTHAUD, R. MANDIGO, W. WOODS (1973): Fatty Acid Composition of Bulls and Steers as Influenced by Age and Dietary Energy Level. *J. Anim. Sci.* 37, 1326-1331.
6. CYGAN-SZCZEGIELNIAK D., BOGDAN JANICKI (2011): Influence of Age and Sex on the CLA and Other Fatty Acids Content in Roe Deer Meat (*Capreolus capreolus* L.). *Folia biol.* 59, 1-13.
7. DOUGHERTY, R. M., GALLI, G, FERRO-LUZZI, A, IACONO, J. M. (1987): Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland and the USA. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987, 45:443-55.
8. HARA, A., N. S. RADIN (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426.
9. LOUHERANTA, E. M., E. S. SARKKINEN, H. M. VIDGREN, U. S. SCHWAB, M. I. J. UUSITUPA (2002): Association of the fatty acid profile of serum lipids with glucose and insulin metabolism during 2 fat-modifi-

ed diets in subjects with impaired glucose tolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 331–337.

10. MARRA, C. A., M. J. ALANIZ (1989): Influence of testosterone administration on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in male and female rats. *Lipids* 24, 1014–1019.

11. MAŠEK, T., K. SEVERIN, J. KOS, Z. JANICKI, N. FILIPOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, P. DŽAJA (2010): Blood lipids and fatty acid composition of abdominal fat in castrated and intact male common pheasant (*Colchicus colchicus*). *Ital. J. Anim. Sci.* 9, 410–413.

12. PURCHAS, W. R., E. C. TRIUMF, B. EGELANDSDAL (2010). Quality characteristics and composition of the longissimus muscle in the short-loin from male and female farmed red deer in New Zealand. *Meat Sci.* 86, 505–510.

13. RULE, D. C. (1997): Direct transesterification of total fatty acids of adipose tissue, and of freeze dried muscle and liver with boron-trifluoride in methanol.

*Meat Sci.* 46, 23–32.

14. SIMOPOULOS, A. M. (1994): Fatty acid composition of skeletal muscle, membrane phospholipids, insulin resistance and obesity. *Nutr. Today* (Jan/Feb):12–16.

15. STORLIEN, L. H., L. A. BAUR, A. D. KRIKETOS, D. A. PAN, G. J. COONEY, A. B. JENKINS, G. D. CALVERT, L. V. CAMPBELL (1996): Dietary fats and insulin action. *Diabetologia* 39, 621–31.

16. TRIUMF, E. C., R. W. PURCHAS, M. MIELNIK, H. K. MAEHRE, E. ELVEVOLL, E. SLINDE, B. EGELANDSDAL (2012): Composition and some quality characteristics of the longissimus muscle of reindeer in Norway compared to farmed New Zealand red deer. *Meat Sci.* 90, 122–129.

17. TU, W. C., R. J. COOK-JOHNSON, M. J. JAMES, B. S. MÜHLHÄUSLER, R. A. GIBSON (2010): Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostagl. Leukotr. Essential Fatty Acids.* 83, 61–68.

## YOUNG VETS VETERINARY DERMATOLOGY

University of Veterinary Medicine (Vetmeduni Vienna), Vienna

13.-14.7.2013.

58



100 young veterinarians, interns, dermatology doctoral students as well as up to 20% of veterinary students (in their last year, or second half of studies) from all around Europe will be educated basic approaches in veterinary dermatology by gifted and experienced speakers as Dr. Griffin and Dr. Rybnicek.