

*Renata B. Kostogrys¹, Angelika Manterys², Magdalena Franczyk-Żarów²,
Adam Florkiewicz³, Agnieszka Filipiak-Florkiewicz⁴, Kinga Topolska⁴,
Marek Sady⁵, Iwona Wybrańska¹*

OCENA WPLYWU DIETY Z DODATKIEM MIĘSA WZBOGACONEGO W SPRZĘŻONE TRIENY KWASU LINOLENOWEGO (CLNA) NA PARAMETRY KOŚCI U MYSZY GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH APOE/LDLR^{-/-}

¹ Katedra Biochemii Klinicznej, Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: dr hab. n. med. *B. Solnica*

² Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³ Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

⁴ Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

⁵ Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Celem badań było określenie wpływu diety z dodatkiem mięsa wzbogaconego w sprzężone trieny kwasu linolenowego (CLnA) na wybrane parametry kości udowej, tj. masę, długość, wytrzymałość u myszy genetycznie zmodyfikowanych ApoE/LDLr^{-/-}.

Nie wykazano istotnego wpływu badanego dodatku na masę ciała i parametry kostne w omawianym zakresie.

Hasła kluczowe: mięso drobiowe, myszy ApoE/LDLr^{-/-}, twardość kości.
Key words: poultry meat, ApoE/LDLr^{-/-} mice, hardness of bone.

Żywność funkcjonalna to żywność, której poza podstawowym zadaniem, jakim jest odżywianie, przypisuje się inne dodatkowe korzystne właściwości, w tym zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób takich jak miażdżycy czy osteoporoza (1). Obecnie na rynku dostępnych jest wiele produktów wzbogacanych w biologicznie aktywne związki, w tym witaminy, składniki mineralne, błonnik pokarmowy czy nienasycone kwasy tłuszczowe (2). W ostatnich latach zwrócono uwagę na kwasy tłuszczowe, w których podwójne wiązania nie są rozdzielone grupą metylenową, tzw. sprzężone kwasy tłuszczowe. Wykazano potencjalnie przeciwmiażdżycowe właściwości tych związków, przy czym koncentrowano się głównie na sprzężonych dienach kwasu linolowego. Sprzężone trieny kwasu linolenowego (ang. Conjugated

Linolenic Acid, CLnA) należą do geometrycznych i pozycyjnych izomerów kwasu oktadekatrienowego (C18:3) (3, 4). Posiadają one podwójne wiązania sprzężone przy pozycjach 9,11,13 lub 8,10,12 łańcucha węglowego (3, 4), np.: kwas α -eleostearynowy (9*cis*, 11*trans*, 13*trans*), kwas katalpowy (9*trans*, 11*trans*, 13*cis*), kwas α -kalendulowy (8*trans*, 10*trans*, 12*cis*), kwas jakarandowy (8*cis*, 10*trans*, 12*cis*) oraz kwas punikowy (9*cis*, 11*trans*, 13*cis*) (3, 4). Istnieją dowody naukowe, że olej z nasion granatu, którego głównym składnikiem jest kwas punikowy wykazuje silne właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne, czyli przeciwdziała m.in. procesom zaangażowanym w powstawanie osteoporozy (5). W związku z niskim spożyciem produktów zawierających CLnA, a jednocześnie korzystnym oddziaływaniem podejmuje się próby wzbogacania powszechnie spożywanej żywności w CLnA. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu diety wzbogaconej w mięso wzbogacone w sprzężone trieny kwasu linolenowego (CLnA) na masę ciała i wybrane parametry kości udowej myszy genetycznie zmodyfikowanych ApoE/LDLr^{-/-}.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniu, przeprowadzonym za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 1 w Krakowie, wykorzystano myszy genetycznie zmodyfikowane szczepu Apolipoprotein E-deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice (ApoE/LDLr^{-/-}) (Nr 110/2015) pochodzące z Jackson Laboratory (n=20) i hodowane w własnej zwierzętarni.

Zwierzęta podzielono, losowo, na 3 grupy: grupa 1 otrzymywała wyłącznie dietę standardową (AIN-93G) (K-kontrola); grupa druga (RO) otrzymywała dietę standardową z dodatkiem liofilizatu mięsa kur żywionych standardową dietą opartą na soi, kukurydzy, pszenicy i oleju rzepakowym (22,3% i 12,5 MJ CP ME/kg) (10,4 g); grupa trzecia (PSO) otrzymywała dietę standardową z dodatkiem liofilizatu mięsa pochodzącego od kur żywionych dietą, w której olej rzepakowy zastąpiono olejem z nasion granatu (mięso zawierające 0,18% CLnA). Myszy przebywały w pomieszczeniu o temperaturze 22–25°C i wilgotności 40%, z zachowaniem 12-godzinne go cyklu światła i ciemności. Masę ciała zwierząt kontrolowano raz w tygodniu. Po 8 tygodniach doświadczenia zwierzęta zostały uśpione poprzez wstrzyknięcie heparyny i podanie thiopentalu (40 mg/100 g m.c.) i następnie zważone. Pobrane prawe kości udowe wypreparowano (tj. oczyszczono z tkanki mięśniowej), po czym zważono je, zmierzono ich długość. Materiał przechowywano w temp. –20°C. Przy użyciu teksturometru TA-XT plus (Texture Analyser – Stable Micro Systems), z przystawką Warnera-Bratzlera, testem trzypunktowego zginania zbadano wytrzymałość mechaniczną kości (parametr wyrażono jako siłę potrzebną do złamania kości w połowie jej długości). Prędkość przesuwu noża wynosiła 5,0 mm/s.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu Dunkana (STATISTICA v. 10.0), po wcześniejszym sprawdzeniu założeń, przy poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie uzyskanych wyników nie wykazano istotnych statystycznie różnic w masie ciała myszy podczas 8-tygodniowego doświadczenia żywieniowego (tab. I).

Tabela I. Przerost masy ciała [g] w zależności od tygodnia eksperymentu. Średnie wartości \pm SDTable I. Body weight gain [g] depending on experimental's time. An average values \pm SD

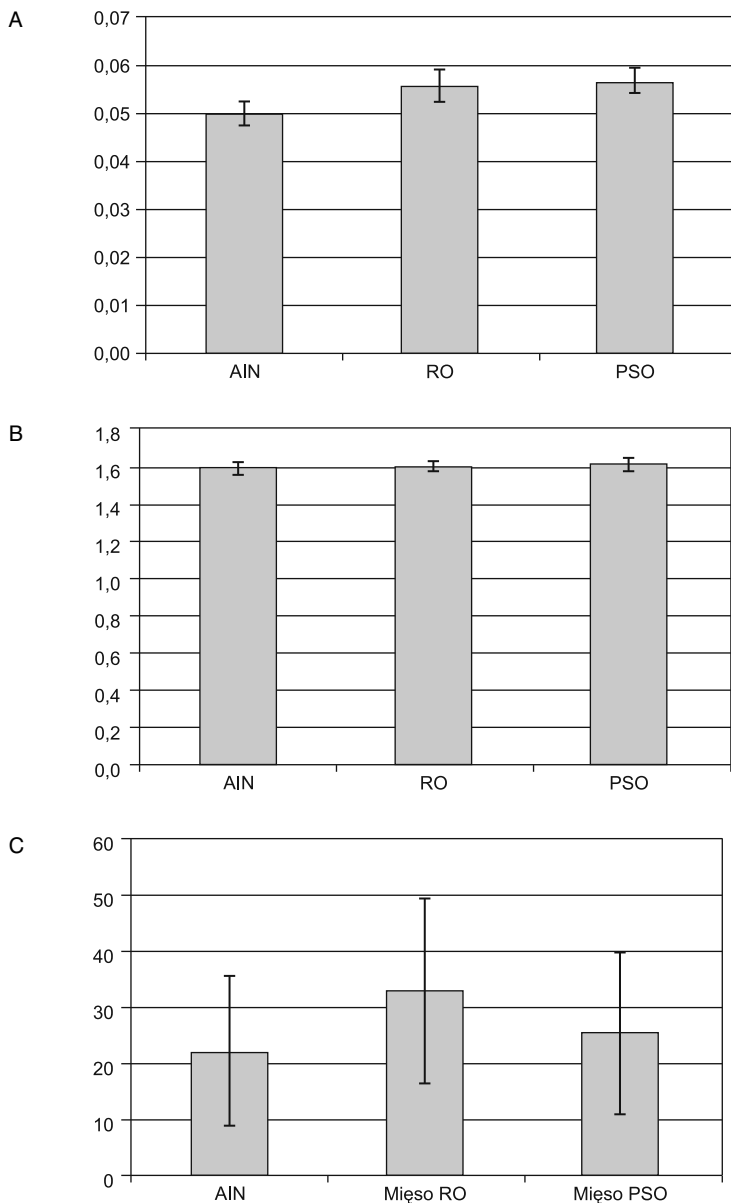
Rodzaj diety	Start	1	2	3	4	5	6	7 tydzień
AIN	21,8 \pm 1,3	20,8 \pm 1,1	21,4 \pm 0,5	21,4 \pm 1,1	21,7 \pm 1,3	21,7 \pm 1,3	21,2 \pm 2,4	22,3 \pm 1,5
RO	23,5 \pm 1,8	23,7 \pm 1,7	23,3 \pm 1,7	23,2 \pm 1,4	23,5 \pm 1,3	23,4 \pm 1,2	24,4 \pm 1,6	23,2 \pm 2,1
PSO	24,6 \pm 2,1	23,1 \pm 1,6	23,7 \pm 3,1	24,1 \pm 2,0	23,1 \pm 1,6	24,1 \pm 1,8	24,4 \pm 2,3	23,5 \pm 1,9

Arao i in. (6), w swoim badaniu podawał szczurom z zaburzeniami lipidowymi kwas punikowy w ilości 1% przez okres 2 tygodni. Nie wykazał istotnych różnic w masie ciała. Według *Koba* i in. (7); oraz *Al-Muammar* i in. (8), sprzężone trieny kwasu linolenowego przyczyniają się do redukcji masy tkanki tłuszczowej, a tym samym wpływają na masę ciała i dodatkowo na masę kostną. *Tsuzuki* i in. (9), *Lech-nen* i in. (10) wykazali, że izomery kwasu linolenowego częściowo przekształcone zostają w CLA (sprężone dieny kwasu linolowego), które z kolei mogą zwiększać lipolizę i wpływać na zmniejszenie akumulacji kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej. Przypuszcza się, że jest to związane ze zmniejszaniem aktywności lipazy lipoproteinowej a zwiększeniem karnityno-palmitoilo-transferazy (CPT-1), jego interakcją z receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksyosomów (PPARy), oraz zwiększeniem ekspresji białek rozpręgających UCP-1 (10). *Koba* i in. (11) wykazali obniżoną masę tkanki tłuszczowej okołonerkowej po 4 tygodniach podawania CLnA.

Stwierdzony w niniejszej pracy brak zmian masy ciała zwierząt może być związany z zbyt niską zawartością tych izomerów w dietach doświadczalnych myszy, bądź niewystarczającym dla wykazania efektu funkcjonalnego czasem trwania doświadczenia.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w masie kości udowych zwierząt (ryc. 1). Żywienie zwierząt dietą z dodatkiem mięsa wzbogaconego w CLnA nie miało istotnego wpływu na długość kości udowej. Średnie wartości długości kości otrzymane dla diet eksperymentalnych i kontrolnej były zbliżone (ryc. 1).

Wpływ oleju z nasion granatu na zahamowanie osteoporozy zaobserwowano podczas 2-tygodniowej suplementacji ekstraktem z granatu u myszy pozbawionych jajników. Suplementacja ta w znaczący sposób wpłynęła na zwiększenie objętości kości oraz liczby beleczek kostnych i – co za tym idzie – na zmniejszenie odstępów między beleczkami. Wg autorów, ekstrakt z granatu ma isotny wpływ na przemiany kostne u myszy (12). *Spilmont* i in. (13) wykazali, że żywienie myszy dietą z 5% PSO znacznie poprawiło mineralną gęstość kości. Korzystne zmiany w tkance kostnej mogły być związane z zahamowaniem tworzenia osteoklastów i poprawą osteoblastogenezy.



Ryc. 1. Wpływ mięsa wzbogaconego w CLnA na masę (A) oraz długość (B) kości udowych oraz zmiany wytrzymałości kości udowej (C) w zależności od składu diety. Średnie wartości \pm SD

Fig. 1. Effect of CLnA-enriched meat on the weight (A) the length (B) and hardness of femur (C) depending on the composition of the diet. An average values \pm SD

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano tendencję do zwiększonej twardości kości u zwierząt otrzymujących mięso standardowe. Siła łamiąca kość

w grupach zwierząt spożywających diety eksperymentalne wynosiła 33,19 N w grupie żywionej dietą zawierającą mięso standardowe oraz 25,53 N w grupie żywionej dietą z dodatkiem mięsa wzbogaconego w CLnA i była wyższa od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (22,31 N).

W swoich badaniach *Saravani* i in. (14) wykazał, że 67-dniowa suplementacja olejem z nasion granatu (10 ml) miała wpływ na poprawę BMD kości odcinka lędźwiowego i krzyżowego kręgosłupa u szczurów. Dodatkowo 30-dniowe spożywanie oleju z nasion granatu miało korzystny wpływ na mineralną gęstość kości u myszy. Dieta ta hamowała również niekorzystne zmiany w mikroarchitekturze beleczek kości (5). Uważa się, że może to być wynikiem transkrypcyjnych zmian w tkance kostnej związanych zarówno z zahamowaniem tworzenia osteoklastów, jak i poprawą osteoblastogenezy (5).

WNIOSKI

1. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że podawanie myszom diety z dodatkiem liofilizatu mięsa wzbogaconego w izomery sprzężonego kwasu linolenowego, jak również mięsa standardowego nie miało wpływu na masę ciała myszy oraz na masę i długość ich kości udowych.

2. Czynniki żywieniowe nie miały również znaczącego wpływu na wytrzymałość mechaniczną kości myszy.

R.B. Kostogryś, A. Manterys, M. Franczyk-Żarów, A. Florkiewicz,
A. Filipiak-Florkiewicz, K. Topolska, M. Sady, I. Wybrańska

ASSESSMENT OF EFFECT OF CHICKEN MEAT ENRICHED IN CONJUGATED LINOLENIC ACID (CLNA) ON BONE PARAMETERS IN APOE/LDLR^{-/-} MICE

Summary

The aim of the study was to assess the effect of CLnA enriched- chicken meat on bone parameters in ApoE/LDLR^{-/-} mice. The animals (four-month old mice) were divided into 3 experimental groups (n=10) and were fed for 8 weeks following diets: control (AIN – 93G), standard chicken meat (RO) and CLnA supplemented chicken meat (PSO). The animals received diet ad libitum. Body weight gain was monitored once a week.

After 8 weeks of feeding, the animals were euthanized, and the femurs were collected. The femoral hardness was analysed by Texture Analyser – Stable Micro Systems.

In the experiment, there were no statistically significant changes in body weight gain of the animals as well as in bone parameters.

PIŚMIENNICTWO

1. *Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S., Sihag M.*: Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.*, 2014; 51: 1633-1653. – 2. *Kudelka W.*: Innowacyjny segment żywności wspierającej zdrowie człowieka. *Nierówności społeczne a wzrost gospodarczy. Modernizacja dla spójności społeczno-ekonomicznej.* 2011; 18: 290-302. – 3. *Hennessy AA., Ross RP., Devery R.*: The health promoting properties of the conjugated isomers of alfa- linolenic acid. *Lipids*, 2011; 46: 105-119. – 4. *Bialek A., Teryks M., Tokarz A.*: Sprzężone trieny kwasu linolenowego (conjugated

linolenic acid- CLnA, (super CLA) - źródła i działanie biologiczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1238-1250. – 5. *Spilmont M., Léotoing L., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Miot-Noirault E., Pilet P., Rios L., Wittrant Y., Coxam V.*: Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *J Nutr. Biochem.*, 2013; 24: 1840-1848. – 6. *Arao K., Wang YM., Inoue N., Hirata J., Cha JY., Nagao K., Yanagita T.*: Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. *Lipids Health Dis.*, 2004; 3: 1-7. – 7. *Koba K., Imamura J., Akashoshi A., Kohno-Murase J., Nishizono S., Iwabuchi M., Tanaka K., Sugano M.*: Genetically modified rapeseed oil containing cis-9,trans-11,cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice. *J Agricul. Food Chem.*, 2007; 55 (9): 3741-3748. – 8. *Al-Muammar MN., Khan F.*: Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*, 2012; 28: 595-604. – 9. *Tsuzuki T., Kawakami Y., Nakaqawa K., Koba K., Iwata T., Ikeda I., Miyazawa T.*: Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J Nutr.*, 2006; 136 (8): 2153-2159. – 10. *Lehnen TE., da Silva MR., Camacho A., Marcadenti A., Lehnen AM.*: A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 2015; 12: 1-11.

11. *Koba K., Akahoshi A., Yamasaki M., Tanaka K., Yamada K., Iwata T., Kamegai T., Tsutsumi K., Sugan M.*: Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, 2002; 37: 343-350. – 12. *Mori-Okamoto J., Otawara-Hamamoto Y., Yamato H., Yoshimura H.*: Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2004; 92 (1): 93-101. – 13. *Spilmont M., Léotoing L., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Miot-Noirault E., Pilet P., Rios L., Wittrant Y., Coxam V.*: Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *J. Nutr. Biochem.*, 2013; 24(11): 1840-1848. – 14. *Saravani M., Kazemi Mehrjerdi H., Mirshahi A., Afkhami Goli A.*: Protective effects of pomegranate seed oil on ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis: A multi-detector computed tomography evaluation. *Veterinary Research Forum*, 2014; 5: 263-267.