

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Medicina Veterinaria

Weterynaria

Veterinary Medicine

10 (4) 2011



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

Wiesław Nagórko (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn), Florian Gambuś (Kraków),
Franciszek Kluza (Lublin), Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Stanisław Socha (Siedlce),
Waldemar Uchman (Poznań), Bogdan Lasota (Szczecin)

Scientific Board of *Medicina Veterinaria*

Wojciech Zawadzki (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – chairman,
e-mail: wojciech.zawadzki@up.wroc.pl

Ryszard Bobowiec (University of Life Sciences in Lublin, Poland), Rose Carabaño (Universidad
Politecnica de Madrid, Spain), Andrzej Depta (University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
Poland), Dusan Jalc (Slovak Academy of Sciences, Slovakia), Qystein V. Sjaastad
(The Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norway), Jacek Szczawiński
(Warsaw University of Life Sciences, Poland), Gustavo Xiccato (University of Padua, Italy)

Bożena Króliczewska (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – secretary
e-mail: bozena.kroliczewska@up.wroc.pl

Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost

ISSN 1644–0676 (print) ISSN 2083–8670 (on-line)

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

Text editor
Ewa Jaworska, e-mail: ewa.jaworska@up.wroc.pl

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Sopocka 23, 50-344 Wrocław, Poland
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 3,4 Printing sheets: 3,25

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Szanowni Państwo,

Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTIARUM POLONORUM Medicina Veterinaria, czasopisma naukowego wydawanego przez wszystkie polskie uczelnie rolnicze i przyrodnicze w 14 seriach. Seria Medicina Veterinaria ukazuje się nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Czasopismo nasze publikuje oryginalne prace z zakresu szeroko rozumianej medycyny weterynaryjnej oraz pokrewnych obszarów wiedzy, z naciskiem na aspekty praktyczne. Publikowane są zarówno oryginalne prace badawcze, jak i artykuły o charakterze monograficznym, w języku polskim lub angielskim, ze streszczeniami w obydwu językach, także wszystkie opisy rysunków i tabel są dwujęzyczne. Prace są recenzowane przez najlepszych specjalistów z danej dziedziny. Również w bieżącym numerze dominują prace o charakterze aplikacyjnym.

Od roku 2007 czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Szczegóły dotyczące przygotowania artykułu oraz wymogi redakcyjne można znaleźć na stronie www.acta.media.pl.

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

It is a great pleasure to introduce you the next issue of ACTA SCIENTIARUM POLONORUM Medicina Vetrinaria, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Medicina Vetrinaria is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences.

The journal publishes original papers of broadly understood veterinary medicine and related topics, with emphasis on practical aspects. There are published both original research articles and monographs, in Polish or English, with abstracts in both languages, as well all figures' and tables' captions are bilingual. The papers are reviewed by the best specialists in the field. This issue is also dominated by the application problems.

Since 2007 the journal has been published as a quarterly. Details concerning the instruction for authors and editorial requirements can be found at www.media.pl.

Editorial Team

EKSPERYMENTALNE METODY WYWOŁYWANIA TĘTNIAKÓW AORTY BRZUSZNEJ ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ŚWINI JAKO DUŻEGO MODELU ZWIERZĘCEGO

Albert Czerski^{1,2}, Jolanta Bujok^{1,2}, Agnieszka Rusiecka^{1,2},
Wojciech Zawadzki^{1,2}, Jan Gnus², Willy Hauser², Kornel Ratajczak²,
Wojciech Witkiewicz²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej,
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu

Streszczenie. Tętniak aorty brzusznej (AAA) stanowi dziesiątą z kolei przyczynę śmierci wśród mężczyzn powyżej 55. roku życia. Metodą leczenia tętniaków o średnicy przewyższającej 5,5 cm jest zabieg operacyjny klasyczny lub wewnątrznaczyniowy. Odsetek zgonów i powikłań związanych z zabiegiem wciąż jest wysoki, co sprawia, że prowadzi się liczne badania nad etiopatogenezą, patofizjologią oraz leczeniem tętniaka aorty brzusznej. Opracowano liczne modele zwierzęce AAA. Do badań wykorzystuje się zwierzęta predysponowane oraz modele, u których tętniaka wywołuje się metodami chemicznymi lub fizycznymi. Świnie stanowią dobry model doświadczalny do udoskonalania nowych technik operacyjnych. Wykorzystuje się liczne metody fizyczne (szczególnie operacyjne) w celu wytworzenia tętniaka u świń oraz łączy się metody chemiczne z mechanicznymi, które stale są ulepszane.

Słowa kluczowe: tętniak aorty brzusznej (AAA), duży model zwierzęcy, świnia, wywoływanie tętniaka

WSTĘP

Tętniak jest miejscowym poszerzeniem wszystkich warstw ściany naczynia z tendencją do powiększania się i pęknięcia. Tętniak aorty brzusznej (abdominal aortic aneurysm, AAA) to rozszerzenie naczynia wynoszące więcej niż 30 mm lub więcej niż 1,5 wielkości

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Albert Czerski, Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Koźuchowska 5, 51-631 Wrocław, e-mail: albert.czerski@up.wroc.pl

średnicy naczynia, które lokalizuje się poniżej odejścia tętnic nerkowych [Collin 1988, Wanhainen 2008]. Zmiana odpowiada za około 2% zgonów mężczyzn powyżej 65. roku życia [Crane 2003]. Częstość występowania tętniaków aorty określana na podstawie ultrasonograficznych badań przesiewowych wynosi do 18,5% u mężczyzn i do 4,2% wśród kobiet [Grootenboer 2009]. Powiększaniu się tętniaka najczęściej nie towarzyszą żadne objawy aż do momentu pęknięcia, które stanowi najpoważniejszą komplikację procesu patologicznego. Innymi, rzadziej pojawiającymi się powikłaniami tętniaków są zator poniżej rozszerzenia, przetoki aortalno-jelitowe lub do jamy brzusznej oraz zakrzepica żył głębokich spowodowana uciskiem na żyłę biodrową [Golledge 2006].

Jedyną obecnie stosowaną metodą leczenia tętniaków jest zabieg operacyjny klasyczny lub wewnątrznaczyniowy. Wskazaniem do operacji jest wykrycie w badaniu obrazowym zmiany o średnicy przewyższającej 55 mm [Horrocks 1998]. Leczenie operacyjne mniejszych tętniaków nie ma pozytywnego wpływu na czas przeżycia pacjenta, natomiast rozszerzenia światła aorty większe niż 55 mm charakteryzują się tendencją do szybszego wzrostu i większym ryzykiem pęknięcia [Thompson 2000]. Pierwszy ze sposobów leczenia operacyjnego polega na wszczępieniu w przestrzeń zaotrzewnową protezy naczyniowej, drugi z kolei na umieszczeniu stent-graftu w świetle zmienionego odcinka naczynia po uzyskaniu dościa z naczynia obwodowego [Moll 2011]. Mimo iż wprowadzenie leczenia techniką wewnątrznaczyniową przyczyniło się do zmniejszenia śmiertelności, odsetek zgonów i powikłań związanych z zabiegiem wciąż stanowi problem. Wśród najczęstszych powikłań pooperacyjnych należy wymienić powstawanie przecieków wewnętrznych między stent-graftem a ścianą tętniaka, przesunięcie stent-graftu oraz dalsze powiększanie lub wznowa tętniaka obok miejsca wszczępienia protezy albo stent-graftu [Blum 1997, Matsumura 1998, Parodi 1997, White 1997]. Z tego względu prowadzi się intensywne badania nad etiopatogenezą, patofizjologią oraz leczeniem tętniaka aorty brzusznej, wykorzystując ku temu modele zwierzęce, wycinki tkanek, kultury komórkowe, symulacje hemodynamiczne z użyciem materiałów syntetycznych oraz komputerowe symulacje biomechaniczne [Dadgar 1997, Evans 1991, Springer 2007, Volodos 2003, Wills 1996]. Model zwierzęcy stanowi bogate źródło wiedzy w tej materii. Opracowano wiele metod wywoływania AAA u zwierząt laboratoryjnych, takich jak mysz, szczur czy królik, co pozwoliło na lepsze poznanie przyczyn rozwoju tętniaka oraz zmian zachodzących w ścianie naczynia. Natomiast mały model zwierzęcy trudno wykorzystać w opracowywaniu nowych metod leczenia chirurgicznego i analizie powikłań związanych z poszczególnymi technikami operacyjnymi. W tym celu tętniaka aorty brzusznej próbuje wywoływać się u świń.

Etiopatogeneza i patofizjologia zmian tętniakowatych

Aorta jest grubościennym elastycznym naczyniem, rozciągającym w się podczas skurczu i wracającym do poprzedniego kształtu w trakcie rozkurczu serca. Składa się z trzech warstw: śródbłonna, błony środkowej i przydanki. W błonie środkowej i przydancie znajdują się włókna sprężyste i kolagenowe ułożone w sposób regularny. Elastyna wytwarzana jest jedynie w okresie dziecięcym, ale ze względu na długi okres półtrwania (70 lat) w warunkach prawidłowych zapewnia odpowiednie właściwości naczynia przez całe życie. Włókna kolagenowe ułożone są naprzemiennie z włóknami elastynowymi, ograniczają zakres rozciągliwości ściany aorty i są bardzo odporne na zrywanie. Na odcinku aorty, poniżej odgałęzień tętnic nerkowych, warstwa włókien tkanki łącznej jest

najcięższa, tam też powstaje zdecydowana większość zmian tętniakowatych aorty (powyżej 90%).

Etiopatogeneza tętniaka aorty brzusznej nie jest w pełni wyjaśniona. Głównymi czynnikami ryzyka rozwoju tętniaka są płeć oraz wiek, zmiana rozwija się w zdecydowanej większości u mężczyzn w podeszłym wieku. Do powstawania tętniaków predysponują też palenie tytoniu oraz hipercholesterolemia i miażdżyca [Golledge 2006, Jamrozik 2000, Lederle 1997]. Przyczyny tych zależności nie są jednoznacznie wyjaśnione. Prawdopodobnie jest to związane ze zwiększaniem sztywności ścian tętnic oraz lepkości krwi u palaczy oraz w przebiegu miażdżycy, co zwiększa naczyniowy „stres ścinania” (vascular shear stress, WSS) [Singh 2010]. Mniejsze znaczenie ma nadciśnienie, a cukrzyca zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby [Alcorn 1996, Pleumeekers 1995].

Postuluje się możliwość udziału czynników genetycznych w powstawaniu tętniaków. Geny mogące mieć tu znaczenie kodują m.in. interleukinę (IL)-15, receptor endotelinowy A i białko związane z receptorem dla LDL [Shibamura 2004]. Za przyczynę odpowiadającą za powstawanie AAA uważa się też stan zapalny naczyń z naciekiem makrofagów i limfocytów (dominują limfocyty Th2) w błonie środkowej i przydince [Freestone 1995]. Makrofagi odpowiadają za produkcję proteaz a limfocyty uwalniają mediatory zapalne, głównie interleukiny oraz TNF- α [Schonbeck 2002]. Kolejnym typem komórek gromadzących się w przydince tętniakowato zmienionej aorty są mastocyty, które mają zdolność uwalniania czynników mogących wywołać stan zapalny naczyń z neowaskularyzacją, atrofię komórek mięśni gładkich aorty oraz aktywować metaloproteiny [Tsuruda 2008, Tchougounova 2005]. Oprócz nich, w ścianie tętniaków, w małych ilościach gromadzą się też komórki NK i limfocyty B [Pearce 1996]. Przyczyną indukującą stan zapalny aorty mogą być czynniki infekcyjne (*Chlamydia pneumoniae*) [Wolski 2002] oraz angiotensyna II [Daugherty 2000].

Postępowanie zmian w ścianie naczyń wiąże się z aktywacją licznych enzymów proteolitycznych prowadzącą do przebudowy błony środkowej i przydanki [Sadek 2008]. Za dominujące uważa się metaloproteiny MMP-9 i MMP-2, których aktywność jest zwiększona w fragmentach tętniaków pobranych od pacjentów i koreluje z wielkością zmiany [Petersen 2000]. Kolejną grupą enzymów, których aktywność wzrasta w ścianie tętniaków, są proteazy cysteinowe [Lindholt 2001]. W rozwoju AAA najprawdopodobniej odgrywają również zaburzenia przepływu krwi, który z laminarnego staje się bezładny. Wpływa to na zmiany w wielkości i gradiencie WSS, co z kolei ma znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania śródbłonna i przenikania do ściany naczyń komórek immunologicznych, głównie monocytów [Chiu 2011].

W wyniku procesów patofizjologicznych w obrazie histopatologicznym tętniaków ludzkich pojawiają się takie zmiany jak: zanik błony środkowej związany z degradacją włókien sprężystych oraz atrofią mięśni gładkich, nadmierne odkładanie włókien kolagenowych w przydince z równoczesnym zmniejszeniem zawartości elastyny i zwiększeniem całkowitej grubości ściany naczyń [Guo 2006]. Ultrastruktura włókien łącznotkankowych również zostaje zaburzona. Włókna elastynowe są poskręcane i tracą postać regularnych pęczków o ciągłym przebiegu, a w przydince rozdzielają je liczne włókna kolagenowe [White 1996]. W błonie środkowej zwiększa się liczba odżywczych naczyń krwionośnych, ścianę naciekają też komórki zapalne, głównie limfocyty T [Hellenthal 2009]. Często też tętniakom towarzyszą zakrzepy przyścienne o charakterystycznej strukturze [Adolph 1997].

Rodzaje metod wykorzystywanych w celu wywołania tętniaka aorty u zwierząt

Po raz pierwszy sposoby wywoływania tętniaków *in vivo* podzielił na kategorie Powell [1991]. Wyróżnił model genetyczny, model z niszczeniem błony środkowej i model hemodynamiczny. Według innego podziału modele zwierzęce można zaklasyfikować do jednej z trzech ogólnych kategorii. Tętniaki u zwierząt genetycznie predysponowanych, tętniaki wywołane metodą fizyczną lub tętniaki uzyskane chemicznie [Tsui 2010]. Obecnie najczęściej stosuje się modele łączące metody z różnych kategorii, tak aby uzyskać zmianę charakteryzującą się cechami tętniaka występującego u ludzi.

Ze zwierząt predysponowanych można wymienić indyki rasy bronz szerokopierśny i bronz standard. Badając je, udowodniono wpływ czynników ciśnienia i zmian w strukturze włókien elastykowych na rozwój tętniaków [Simpson 1968, 1970]. Kolejną predysponowaną rasą zwierząt okazały się myszy „plamiste” (blotchy), u których występuje defekt sieciowania włókien sprężystych i kolagenowych [Brophy 1988]. Następną grupę zwierząt stanowią zwierzęta modyfikowane genetycznie. Jednym z lepiej zbadanych modeli modyfikowanych są myszy pozbawione genów dla receptorów lipoproteinowych lub genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie włókien łącznotkankowych [Mäki 2002, Tangirala 1995]. Najważniejsze modele myszy modyfikowanych genetycznie zostały zestawione w tabeli 1.

Tabela 1. Myszy nokautowe jako modele AAA

Table 1. Knockout mice models of AAA

Myszy bez genu dla receptora ApoE [Zhang 1992]	Niszczenie błony środkowej z jednoczesnym pogrubieniem przydanki
ApoE receptor deficient mice	Destruction of the media counteracted by thickening of the adventitia
Myszy bez genu dla receptora dla LDL [Prescott 1999]	Rozwój zmian miażdżycowych i tętniaków, którym towarzyszy zwiększona ekspresja MMP-3, MMP-12 i MMP-13
LDL receptor deficient mice	Development of complex atherosclerosis and medial elastolysis (aneurysm) accompanied by overexpression of MMP-3, MMP-12, and MMP-13
Myszy bez genów dla ApoE i śródbłonkowej NOS [Kuhlencordt 2001]	U 25% myszy powstały miażdżycowe tętniaki aorty powyżej tętnic nerkowych, maksymalne powiększenie naczynia o 180%
ApoE/endothelial NO synthase double-knockout mice	25% of mice developed atherosclerotic suprarenal abdominal aortic aneurysms, with a maximal increase in vessel diameter of 180%
Myszy bez genów dla LRP mięśni gładkich i receptora dla LDL [Boucher 2003]	Aorty systematycznie powiększające się, z towarzyszącym pogrubianiem ściany, zwiększeniem aktywności metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9)
Smooth muscle specific LRP/LDL receptor double knockout mice	Aortas consistently distended and dilated, accompanied by thickening of the aortic wall, modestly increased matrix metalloproteinase activity (MMP-2 and MMP-9)
Myszy bez genów dla ApoE i tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 [Silence 2002]	Tętniaki charakteryzujące się ścieńczeniem ściany aorty, fragmentacją i rozrywaniem błon sprężystych w błonie środkowej
ApoE/Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 double knockout mice	Aneurysms characterized by thinning of the aortic wall and fragmentation and rupture of elastic membranes across the media

Legenda – Legend:

LRP – low-density lipoprotein receptor-related protein, białko związane z lipoproteiną o małej gęstości

LDL – low-density lipoprotein, lipoproteina o małej gęstości

ApoE – apolipoprotein E, apolipoproteina E

NOS – nitric oxide synthase, syntaza tlenu azotu

IU – international unit, jednostka międzynarodowa

Ang II – angiotensin II, angiotensyna II

MMP – metalloproteinase, metaloproteinaza

Fizyczne metody uzyskiwania tętniaków stanowią niejednorodną grupę procedur. Nadają się najlepiej do badania nowych sposobów leczenia, szczególnie pomocne są w testowaniu stent-graftów. Pierwszą z nich jest chirurgiczne niszczenie błony środkowej i przydanki [Economou 1960]. Kolejne opisane metody to uszkodzenie ściany naczynia laserem, sztuczne zwężenie światła aorty (za którym powstaje rozszerzenie), rozszerzanie światła naczynia niekompatybilnym balonem angioplastycznym, zastępowanie fragmentu ściany aorty rurową protezą z tworzywa syntetycznego (dakron, poliuretan), wszczepianie w przednią ścianę naczynia „łaty” z tworzywa sztucznego (dakron) lub naturalnego pochodzącego od biorcy bądź heterologicznego (fragment żyły szyjnej wewnętrznej krwi utrwalonej w aldehydzie glutarowym, fragment ściany aorty pochodzący od innego gatunku) [Allaire 1994, Balko 1986, Castaneda-Zuniga 1980, Dobrin 1991, Laborde 1992, Quigley 1987, Verbin 1995, Whitbread 1996, Zollikofer 1987]. W technice wszywania „łaty” w ścianę aorty (anterior patch technique) wykorzystuje się takie naturalne materiały jak powięź mięśnia prostego brzucha, jelito czcze, żyła biodrowa lub łata z dwóch warstw otrzewnej [Criado 1995, Eton 1996, Maynar 2003, Palmaz 1995].

Metody fizyczne dobrze nadają się do testowania nowych technik operacyjnych oraz powikłań z nimi związanych. Jednak procesy patofizjologiczne zachodzące podczas rozwoju tętniaków w modelach różnią się od tych u ludzi. Po wszczepieniu „łaty” dochodzi do wzrostu liczby fibroblastów i komórek mięśni gładkich, czego nie obserwuje się w AAA u ludzi [Molacek 2009]. Metody wykorzystujące miejscowe zwężenie aorty i zaburzenie przepływu ze zmianami WSS również nie oddają w pełni charakterystyki patofizjologii tętniaków aorty brzusznej, ponieważ u podstawy ich rozwoju leżą inne mechanizmy niż stenoza.

Tabela 2. Metody fizyczne wywoływania tętniaków aorty brzusznej
Table 2. Physical methods of abdominal aortic aneurysm formation

1.	Usuwanie kompleksu intima-media Intima media stripping
2.	Uszkodzenie laserem Laser injury
3.	Rozszerzenie balonikiem angioplastycznym Angioplasty balloon dilatation
4.	Rozszerzenie za miejscem zwężenia Poststenotic dilatation
5.	Wstawienie protezy Conduit Interposition
6.	„Łata” w przedniej ścianie naczynia Anterior patch

Metody chemiczne polegają na aplikacji różnych substancji chemicznych do światła aorty lub na ścianę naczynia, które spowodują stopniowe rozszerzenie danego odcinka aorty brzusznej. Są szeroko stosowane u zwierząt laboratoryjnych, takich jak myszy, szczury oraz króliki i pomagają w wyjaśnieniu patofizjologii schorzenia jak i w opracowaniu protokołów leczenia zachowawczego. Wśród substancji chemicznych stosowanych do wywoływania tętniaków aorty brzusznej należy wymienić chlorek wapnia,

który aplikuje się zewnątrznaczyniowo w celu wywołania zmian w przydacie i błonie środkowej. Pierwsze doniesienia o możliwości zastosowania chlorku wapnia w wywoływaniu rozszerzenia światła tętnic pochodzą z badań na królikach [Gertz 1988]. Po połączeniu z dietą wysokocholesterolową i tioglikolatem powoduje on pojawienie się zmian tętniakowatych na odcinku aorty brzusznej poniżej odejścia tętnic nerkowych u królików. Podobne wyniki udało uzyskać się u myszy [Chiou 2001, Freestone 1997]. Innym modelem chemicznym zastosowanym u myszy nokautowych pozbawionych receptorów dla ApoE lub LDL jest podawanie podskórne angiotensyny II, która przyspiesza pojawianie się zmian atherosklerotycznych i prowadzi do rozwoju tętniaków na odcinku powyżej odgałęzienia tętnic nerkowych [Manning 2002] (tab. 3a). Bardzo szerokie zastosowanie w wywoływaniu tętniaków aorty brzusznej u małych zwierząt znalazła elastaza (tab. 3b i 3c). Enzym podaje się do światła czasowo odizolowanego odcinka aorty lub aplikuje się go od zewnątrz. Zastosowanie tej metody pozwoliło na zbadanie wielu czynników predysponujących oraz wpływu leczenia farmakologicznego na progresję zmian tętniakowatych [Anidjar 1992, Thompson 2006]. Metodę z elastazą próbuje się udoskonalać przez łączenie z innymi substancjami. Enzymem proteolitycznym używanym wraz z elastazą do wywoływania tętniaków jest kolagenaza. Zastosowano także połączenie elastazy z chlorkiem wapnia u szczurów [Tanaka 2009].

Tabela 3a. Metody chemiczne wywoływania tętniaków aorty brzusznej

Table 3a. Chemical methods of abdominal aortic aneurysm formation

Chlorek wapnia – Calcium chloride	
Królik [Freestone 1997]	Uszkodzenie śródbłonna i błony środkowej ze zwapnieniami (aorta miażdżycowa, podawano tioglikolat)
Rabbit	Medial injury with calcification and endothelial injury (atherosclerotic, thioglycollate treatment)
Szczur	Znaczny rozkład elastyny w błonie środkowej, widoczny jako ubytki w lamelach
Rat	Extensive breakdown of medial elastin, visible as gaping holes in the elastic lamellae
Mysz [Chiou 2001]	Nacieki zapalne w błonie wewnętrznej i środkowej, uszkodzenie sieci włókien elastycznych
Mouse	Inflammatory infiltrates in the intima and media layers, disruption of the elastic network within the media
Fosforan wapnia – Calcium phosphate	
Mysz (aplikacja CaCl ₂ i PBS na aortę) [Yamanouchi 2012]	Rozkład włókien sprężystych, apoptoza komórek mięśni gładkich, nacieki makrofagów, zwapnienia tkanki
Mouse (application of CaCl ₂ and PBS onto aorta)	Elastin degradation, smooth muscle cell apoptosis, macrophage infiltration and tissue calcification
Angiotensyna II – Angiotensin II	
Mysz bez genu dla ApoE [Daugherty 2000]	Tętniaki głównie u samców, gromadzenie makrofagów, rozkład elastyny (500 do 1000 ng · kg ⁻¹ · min ⁻¹ Ang II s.c. wszczepioną pompą osmotyczną)
ApoE knockout mice	Aneurysm predominantly in males, macrophage accumulation associated with elastin degradation (500 to 1000 ng · kg ⁻¹ per minute Ang II, s.c. implanted osmotic mini-pumps)

Tabela 3b. Metody chemiczne wywoływania tętniaków aorty brzusznej – metody enzymatyczne
Table 3b. Chemical methods of abdominal aortic aneurysm formation – enzymatic methods

Elastaza – Elastase	
Mysz [Pyo 2000] Mouse	Znaczne zniszczenie lameli włókien sprężystych, naciek zapalny (makrofagi) w przydancie, neutrofile w obwodowej części Extensive destruction of the elastic lamellae, pronounced inflammatory infiltrate (macrophages) in adventitia, neutrophils on the peripheral aspects of the adventitia
Szczur [Anidjar 1990] Rat	Utrata tkanki sprężystej, złogi włóknika w świetle tętniaka Loss of elastic tissue, fibrin deposits in the aneurysmal lumen
Królik [Kobayashi 2004] Rabbit	Zgrubienie błony wewnętrznej, fragmentacja błony sprężystej, ścieńczenie błony środkowej Intimal thickening, fragmentation of internal elastic lamina, media thinning
Pies [Strindberg 1998] Dog	Zniszczenie struktury sieci włókien we wszystkich warstwach aorty, zmniejszenie liczby komórek mięśni gładkich, zakrzepy śródścienne (wcześniejsze rozszerzenie aorty balonikiem, na aortę działano też kolagenazą) Disruption of elastic network of the intima, media, and adventitia, reduction in the number of smooth muscle cells, intramural thrombi (earlier distention with balloon catheter, aorta treated with collagenase also)

Tabela 3c. Tętniaki aorty brzusznej wywołane za pomocą elastazy u świń
Table 3c. Elastase induced AAA in swine

Elastaza – Elastase	
Infuzja elastazy <i>in vitro</i> [Tierney 2010] <i>In vitro</i> elastase infusion	Zmniejszenie zawartości włókien elastycznych o średnio 73,02% (20 IU · l ⁻¹ , 4 godz.; rozszerzenie balonem po trawieniu elastazą) Average 73,02% decrease in elastin content (20 IU · l ⁻¹ , 4 h; ballon inflation after elastase treatment)
Infuzja samej elastazy <i>in vivo</i> [Marinov 1997] <i>In vivo</i> elastase solely	Nie uzyskano tętniaków, uszkodzenie włókien sprężystych błony środkowej, zmniejszenie liczby komórek mięśni gładkich, złogi wapnia, zmiany martwicze No aneurysm obtained, destruction of elastic fibers of medial lamina, reduction of smooth muscle cells, calcium deposits, necrotic lesions
Infuzja 30 IU elastazy i 8000 IU kolagenazy <i>in vivo</i> [Hynecek 2007] <i>In vivo</i> elastase 30 IU and collagenase 8000 IU infusion	Częściowa utrata śródłonka, naciek neutrofilów, rozkład włókien sprężystych; częściowe cofnięcie zmian po 3–6 tygodniach Partial endothelial loss, mural neutrophil infiltrate, elastin disruption; partial recovery after 3–6 weeks (after distention with balloon catheter)
Infuzja elastazy i założenie opaski zwężającej <i>in vivo</i> [Moláček 2009] <i>In vivo</i> elastase infusion with stenosing cuff application	Zgrubienie błony wewnętrznej, zniszczenie i fragmentacja błony sprężystej wewnętrznej i włókien sprężystych błony środkowej, proliferacja komórek mięśni gładkich, naciek zapalny w błonie środkowej i przydancie Thickening of the tunica intima, damaged and fragmented lamina elastica interna, damaged elastic membranes in the tunica media, SMC proliferation, inflammatory infiltration in the tunica media and tunica adventitia

Techniki wywoływania AAA zastosowane u świń

Początkowo jako duży model zwierzęcy tętniaka aorty brzusznej służyły psy [Economou 1960]. Jednak ze względów etycznych oraz przez różnice w metabolizmie lipidowym między psem a człowiekiem preferowanym modelem stała się świnia (*Sus scrofa*) (tab. 4). Opracowano wiele metod wywoływania tętniaków aorty brzusznej u świń, głównie fizycznych, które służą do badania nowych technik operacyjnych w leczeniu AAA. W nowszych badaniach nad wywoływaniem tętniaków u świń wykorzystuje się łączenie metod fizycznych z chemicznymi, co pozwala na uzyskanie zmian bardziej przypominających tętniaki naturalnie występujące u ludzi.

Tabela 4. Zalety i wady świń jako modelu do badania tętniaków aorty brzusznej

Table 4. Advantages and disadvantages of porcine model of AAA

Zalety Advantages	Wady Disadvantages
Anatomia układu krążenia podobna do ludzkiej [McKenzie 1996] Human-like cardiovascular anatomy	Wysokie koszty High costs
Rozmiar ciała pozwalający na testowanie technik operacyjnych i protez [Swindle 1988] Body size allowing testing of surgery techniques and new prosthetic devices	Mało precyzyjna charakterystyka genotypu Less precise genetic characterization
Spontaniczny rozwój zmian miażdżycowych szczególnie w aorcie brzusznej [Skold 1966] Development of spontaneous atherosclerotic lesions comparable with that of human, particularly in abdominal aorta	Trudności w utrzymaniu i obsłudze odpowiednio licznej grupy zwierząt Difficulties in maintaining sufficiently large groups of animals and their handling
Metabolizm lipoprotein podobny do ludzkiego (średnio 60% cholesterolu transportowane jako LDL) [Kieft 1991] Similar to human lipoprotein metabolism (average 60% of cholesterol transported as LDL)	Problem z uzyskaniem modeli transgenicznych i pozyskaniem przeciwciał Difficult to access transgenic models and antibodies
	Mniejszy rozmiar dużych tętnic Smaller central veins

Jedną z szerzej stosowanych technik u świń jest wszywanie w ścianę aorty „łaty” z autologicznego materiału. Wykorzystano w tym celu między innymi powieź mięśnia prostego brzucha oraz otrzewną złożoną w dwie warstwy [Jordan 1998, Maynar 2003]. U świń zastosowano także „łaty” z dakronu [Diaz 2004, Vos 2004]. Metoda wywoływania tętniaków polega na uzyskaniu dojścia operacyjnego do aorty na odcinku pomiędzy odgałęzieniami tętnic nerkowych a rozdwojeniem aorty. Fragment naczynia czasowo zaciska się na obu końcach, wykonuje podłużne cięcie, przepłukuje się wewnątrz naczynia heparyną. Po nacięciu aorty dokonuje się resekcji fragmentu ściany i w to miejsce przyszywa wcześniej przygotowaną, elipsoidalną łatę, która zwiększa średnicę naczynia na obszarze cięcia. Tak uzyskane tętniaki charakteryzują się dużym rozmiarem, potencjałem do dalszego wzrostu i w zależności od użytego materiału skłonnością do pęknięcia. Dużą tendencją do powiększania się i pęknięcia zaobserwowano po zastosowaniu dwuwarstwowego fragmentu otrzewnej. „Łaty” z autologicznych tkanek dobrze przyjmują się

w ścianie naczynia, ulegają endoteliazizacji, zwiększa się w nich ilość kolagenu. Służą przede wszystkim do testowania nowych stent-graftów oraz badania komplikacji pooperacyjnych, takich jak przecieki wewnątrz tętniaka czy odnowa zmiany po leczeniu operacyjnym [Jordan 1998]. Ze względu na zastosowanie obcej tkanki/materiału nie stanowią jednak dobrej metody do oceny procesów patofizjologicznych zachodzących w aorcie w trakcie powstawania i rozwoju zmian [Maynar 2003]. U świń wykorzystano też materiał ksenogeniczny do wytworzenia zmiany tętniakowatej w aorcie brzusznej. W ścianę naczynia wsztyto zakonserwowany w aldehydzie glutarowym fragment żyły biodrowej pochodzącej od krowy. Uzyskano w ten sposób dwukrotne rozszerzenie światła aorty. Zwierzęta po dwóch tygodniach od zabiegu posłużyły do testowania wewnątrznaczyniowej metody leczenia chirurgicznego tętniaków [Whitbread 1996].

Na świniami próbowano też zastosować model chemiczny w wykorzystaniem elastazy. O ile udało się wywołać zmiany w tętnicy szyjnej z wykorzystaniem elastazy oraz doprowadzić do rozszerzenia fragmentów aorty brzusznej *ex vivo*, o tyle próby wywołania tętniaka aorty u żywych świń nie powiodły się, mimo iż dochodziło do zniszczenia włókien sprężystych na odcinku, na który działał enzym [Goericke 2009, Kratzberg 2009, Marinov 1997]. Zaczęto modyfikować metodę z elastazą, dodając kolejne elementy do postępowania. Nasz zespół połączył nasączenie odcinka aorty elastazą z rozszerzeniem mechanicznym ściany naczynia za pomocą balonu angioplastycznego. Zmianę udało się wywołać tylko u jednego zwierzęcia. Nie była ona duża (poniżej 150% średnicy zdrowego naczynia) i miała tendencję do zanikania podczas 5-tygodniowego okresu monitoringu [dane niepublikowane]. Kolejnym udoskonaleniem metody było zastosowanie opaski uciskającej powyżej odcinka aorty brzusznej, na który podziałano enzymem tak, aby wywołać turbulentny przepływ krwi. Na aortę działało 5 ml roztworu elastazy o stężeniu 5 UI/ml przez 30 minut, po czym założono opaskę. Wymiary aorty zwiększyły się z $7,29 \pm 0,76$ do $15,6 \pm 1,21$ mm (około 214%) po trzech tygodniach od procedury. Zmiany histologiczne obejmowały pogrubienie błony wewnętrznej, degradację włókien sprężystych w błonie środkowej, nacieki zapalne w całej błonie środkowej i przydancie, co przypomina obraz histopatologiczny AAA u ludzi [Moláček 2009].

Kolejną metodą opracowaną u świń jest połączenie mechanicznego rozszerzania światła aorty za pomocą balonu angioplastycznego z nadtrawianiem z użyciem mieszaniny enzymów proteolitycznych, mianowicie elastazy i kolagenazy. Po rozszerzeniu aorty brzusznej balonem do odizolowanego odcinka wprowadzono pod ciśnieniem 50 ml roztworu zawierającego 8000 IU kolagenazy i 30 IU elastazy na 20 minut, aż zauważono przeciekanie roztworu przez ścianę naczynia. Tuż po zabiegu odnotowano rozszerzenie aorty o $62 \pm 35\%$, a w szóstym tygodniu obserwacji w obrazie MRI zmiana miała średnicę wynoszącą $194 \pm 37\%$ normalnego wymiaru naczynia. Obraz histologiczny tętniaków ulegał zmianom w czasie. Początkowo obserwowano zanik komórek endotelium i mięśni gładkich oraz degradację włókien sprężystych i kolagenowych. W szóstym tygodniu endotelium uległo regeneracji, zauważono też częściową odnowę warstwy mięśniowej, natomiast postępowały zmiany we włóknach łącznotkankowych, pojawiły się ogniska zwapnienia otoczone przez limfocyty [Hyneček 2007]. Fragmenty tętniaków uzyskanych w ten sposób poddano badaniom ekspresji genów i stwierdzono, że zwiększeniu ulega ekspresja metaloproteinaz i katepsyn oraz TNF α , interleukin i aktywatora plazminogenu tkankowego [Sadek 2008]. Są to czynniki, które najprawdopodobniej mają udział w etiopatogenezie AAA u ludzi. Nasz zespół osiągnął podobne rezultaty, modyfikując meto-

dę. Po mechanicznym rozszerzeniu światła aortę nasączano od wewnątrz mieszaniną enzymów (6000 IU kolagenazy i 200 IU elastazy przez 20 minut). Tętniaki udało się wywołać u wszystkich poddanych procedurze zwierząt, w piątym tygodniu osiągnęły wielkość odpowiadającą około 173% normalnej średnicy aorty na tym odcinku. Zmiany histologiczne przypominały te zaobserwowane przez poprzedni zespół [dane niepublikowane].

Tabela 5. Wymiary tętniaków aorty brzusznej po 3 tygodniach od wywołania zmiany metodą fizykochemiczną

Table 5. Abdominal aortic aneurysm size after 3 weeks from physicochemical procedure

Nr No	Metoda Procedure	Rozmiar AAA po 3 tygodniach AAA size after 3 weeks
1.	Elastaza z opaską zwązającą światło Elastase with stenosing cuff	214% normalnego wymiaru aorty [Moláček 2009] 214% of normal aorta diameter
2.	Rozszerzenie mechaniczne i działanie elastazą/kolagenazą Mechanic dilatation and elastase/collagenase treatment	182% normalnej średnicy aorty [Hyneček 2007] 182% of normal aorta diameter 170% normalnej średnicy aorty [dane niepublikowane] 170% of normal aorta diameter [not published]
3.	Rozszerzenie mechaniczne i działanie elastazą/kolagenazą oraz CaCl ₂ Mechanic dilatation and elastase/collagenase plus CaCl ₂ treatment	234% normalnej średnicy aorty [dane niepublikowane] 234% of normal aorta diameter after 2 weeks [data not published]

W naszym ośrodku wykorzystano też połączenie metody enzymatycznej z nasączeniem ściany aorty od zewnątrz roztworem chlorku wapnia. Procedura nie różniła się znacząco od metody z wykorzystaniem elastazy i kolagenazy. Po uzyskaniu dojścia operacyjnego pozaotrzewnowo zaciśnięto odcinek aorty brzusznej poniżej tętnic nerkowych oraz przed rozgałęzieniem aorty, przez małe nacięcie wprowadzono kateter zakończony balonikiem, który z kolei wypełniono powietrzem tak, aby poszerzyć światło naczynia. Następnie, tym samym otworem wprowadzono pod ciśnieniem mieszaninę enzymów proteolitycznych o składzie identycznym jak we wcześniejszej metodzie. Końcowym etapem procedury było nałożenie na ścianę aorty od zewnątrz jałowej gazy nasączonej 0,5M roztworem chlorku wapnia. W drugim tygodniu obserwacji w obrazie USG tętniaki miały wielkość około 237% średnicy zdrowego naczynia (rys. 1). Prowadzone są dalsze obserwacje i badania, które pozwolą ustalić w jakim stopniu uzyskane tętniaki aorty brzusznej u świń naśladują zmiany u ludzi.



Rys. 1. Niezmieniona aorta świni uwidoczniiona za pomocą ultrasonografii
 Fig. 1. Normal swine abdominal aorta visualized by ultrasonography



Rys. 2. Tętniak aorty brzusznej u świni po zastosowaniu metody kolagenazowo-elastazowej z CaCl_2 , badanie kontrolne po dwóch tygodniach
 Fig. 2. AAA in swine after treatment with collagenase/elastase and CaCl_2 , follow-up examination in the 2nd week

U świń wywoływano też tętniaki za pomocą powtarzanego nadmuchiwanie balonu angioplastycznego w świetle naczynia, aż do osiągnięcia przez aortę brzuszną średnicy 1,5 razy większej od normalnego wymiaru naczynia. W ten sposób uzyskuje się AAA, które wykorzystuje się w badaniu stent-graftów. Nie wiadomo jednak, czy w taki sposób wywołane zmiany utrzymują się przez dłuższy czas [Raman 2005].

PODSUMOWANIE

Tętniaki aorty brzusznej są problemem, który zyskuje na znaczeniu w starzejących się populacjach krajów rozwiniętych. Stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów wśród mężczyzn powyżej 55. roku życia. Leczenie operacyjne ciągle wiąże się z dużym odsetkiem powikłań. Z tego względu bardzo duże zainteresowanie środowisk naukowych budzi opracowywanie modeli zwierzęcych, które pozwolą na lepsze poznanie procesów leżących u podstawy rozwoju AAA oraz będą służyły udoskonalaniu metod leczenia zarówno farmakologicznego, jak i operacyjnego. Świnie, z uwagi na duże podobieństwo do człowieka w zakresie budowy i czynności układu krążenia, wydają się stanowić doskonały model badawczy. Jak dotąd udało się dobrze opracować chirurgiczne metody tworzenia tętniaków aorty brzusznej u świń, które jednak nie odzwierciedlają w pełni zmian występujących u człowieka. Najnowsze badania skupiają się na metodach wywołania AAA, które podlegają procesom patofizjologicznym podobnym do tych u ludzi. Obiecujące pod tym względem wydają się być techniki z wykorzystaniem połączenia mechanicznego rozszerzania światła naczynia z działaniem enzymów proteolitycznych oraz chlorku wapnia.

PIŚMIENNICTWO

- Adolph R., Vorp D.A., Steed D.L., Webster M.W., Kameneva M.V., Watkins S.C., 1997. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 25 (5), 916–26.
- Alcorn H.G., Wolfson S.K. Jr, Sutton-Tyrrell K., Kuller L.H., O’Leary D., 1996. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 963–970.
- Allaire E., Guettier C., Bruneval P., Plissonnier D., Michel JB., 1994. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J. Vasc. Surg.* 19, 446–56.
- Anidjar S., Salzmann J.L., Gentric D., Lagneau P., Camilleri J.P., Michel J.B., 1990. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation.* 82, 973–981.
- Anidjar S., Osborne-Pellegrin M., Coutard M., Michel JB., 1992. Arterial hypertension and aneurysmal dilatation. *Kidney. Int. Suppl.* 37, 61–66.
- Balko A., Piasecki G.J., Shah D.M., Carney W.I., Hopkins R.W., Jackson B.T., 1986. Transfemoral placement of intraluminal polyurethane prosthesis for abdominal aortic aneurysm. *J. Surg. Res.* 40 (4), 305–309.
- Blum U., Voshage G., Lammer J., Beyersdorf F., Töllner D., Kretschmer G., Spillner G., Polterauer P., Nagel G., Hölzenbein T., 1997. Endoluminal stent-grafts for infrarenal abdominal aortic aneurysms. *N. Engl. J. Med.* 336, 13–20.
- Boucher P., Gotthardt M., Li W.P., Anderson R.G.W., Herz J., 2003. LRP: Role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science.* 300, 329–332.
- Brophy C., Tilson J.E., Tilson M.D., 1988. Propranolol delays the formation of aneurysms in the male blotchy mouse. *J. Surg. Res.* 44 (6), 687–689.
- Castaneda-Zuniga W.R., Formanek A., Tadavarthy M., Vlodayer Z., Edwards J.E., Zollikofer C., Amplatz K., 1980. The mechanism of balloon angioplasty. *Radiology* 135 (3), 565–71.
- Chiou A.C., Chiu B., Pearce W.H., 2001. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J. Surg. Res.* 99 (2), 371–6.

- Chiu J.J., Chien S., 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol. Rev.* 91 (1), 327–87.
- Collin J., Walton J., Araujo L., Lindsell D., 1988. Oxford screening programme for abdominal aortic aneurysm in men aged 65 to 74 years. *Lancet* 2, 613–615.
- Economou S.G., Taylor C.B., Beattie E.J. Jr, Davis C.B. Jr, 1960. Persistent experimental aortic aneurysms in dogs. *Surgery.* 47, 21–28.
- Crane J., Cheshire N., 2003. Recent developments in vascular surgery. *Br. Med. J.* 327, 911–915.
- Criado E., Marston W.A., Woosley J.T., Ligush J., Chuter T.A., Baird C., Suggs C.A., Mauro M.A., Keagy B.A., 1995. An aortic aneurysm model for the evaluation of endovascular exclusion prostheses. *J. Vasc. Surg.* 22 (3), 306–314.
- Dadgar L., Marois Y., Deng X., Guidoin R., 1997. Arterial wall mechanical characteristics after treatment in collagenase: an *in vitro* aneurysm model. *Clin. Invest. Med.* 20, 25–34.
- Daugherty A., Manning M.W., Cassis L.A., 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1605–1612.
- Diaz S., Uzieblo M.R., Desai K.M., Talcott M.R., Bae K.T., Geraghty P.J., Parodi J.C., Sicard G.A., Sanchez L.A., Choi E.T., 2004. Type II endoleak in porcine model of abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 40 (2), 339–344.
- Dobrin P.B., 1991. Poststenotic dilatation. *Surg. Gynaecol. Obstet.* 172, 503–8.
- Eton D., Warner D., Owens C., McClenic B., Cava R., Ofek B., Borhani M., Baraniewski H., Schuler J.J., 1996. Results of endoluminal grafting in an experimental aortic aneurysm model. *J. Vasc. Surg.* 23 (5), 819–829.
- Evans C.H., Georgescu H.I., Lin C.W., Mendelow D., Steed D.L., Webster M.W., 1991. Inducible synthesis of collagenase and other neutral metalloproteinases by cells of aortic origin. *J. Surg. Res.* 51, 399–404.
- Freestone T., Turner R.J., Coady A., Higman D.J., Greenhalgh R.M., Powell J.T., 1995. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 1145–1151.
- Freestone T., Turner R.J., Higman D.J., Lever M.J., Powell J.T., 1997. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1), 10–17.
- Gertz S.D., Kurgan A., Eisenberg D., 1988. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 81, 649–56.
- Goericke S.L., Parohl N., Albert J., Dudda M., Forsting M., 2009. Elastase-induced aneurysm in Swine: proof of feasibility in a first case. A technical note. *Interv. Neuroradiol.* 15 (4), 413–416.
- Grootenboer N., Bosch J.L., Hendriks J.M., van Sambeek M.R., 2009. Epidemiology, aetiology, risk of rupture and treatment of abdominal aortic aneurysms: does sex matter? *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 38 (3), 278–284.
- Golledge J., Muller J., Daugherty A., Norman P., 2006. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2605–2613.
- Guo D.C., Papke C.L., He R., Milewicz D.M., 2006. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann. NY Acad. Sci.* 1085, 339–352.
- Hellenthal F.A., Geenen I.L., Tejjink J.A., Heeneman S., Schurink G.W., 2009. Histological features of human abdominal aortic aneurysm are not related to clinical characteristics. *Cardiovasc. Pathol.* 18 (5), 286–293.
- Horrocks M. et. the UK Small Aneurysm Trial Participants., 1998. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet* 352, 9–55.

- Hynecek R.L., DeRubertis B.G., Trocciola S.M., Zhang H., Prince M.R., Ennis T.L., Kent K.C., Faries P.L., 2007. The creation of an infrarenal aneurysm within the native abdominal aorta of swine. *Surgery* 142 (2), 143–149.
- Jamrozik K., Norman P.E., Spencer C.A., Parsons R.W., Tuohy R., Lawrence-Brown M.M., Dickinson J.A., 2000. Screening for abdominal aortic aneurysm: lessons from a population-based study. *Med. J. Aust.* 173, 345–350.
- Jordan W.D. Jr, Sampson L.K., Iyer S., Anderson P.G., Lyle K., Brown R.J., Luo J., Roubin G.S., 1998. Abdominal aortic aneurysm repair via percutaneous endovascular stenting in the swine model. *Am. Surg.* 64 (11), 1070–1073.
- Kieft K.A., Bocan T.M., Krause B.R., 1991. Rapid on-line determination of cholesterol distribution among plasma lipoproteins after high-performance gel filtration chromatography. *J. Lipid Res.* 32, 859–66.
- Kobayashi H., Matsushita M., Oda K., Nishikimi N., Sakurai T., Komori K., 2004. Effects of atherosclerotic plaque on the enlargement of an experimental model of abdominal aortic aneurysm in rabbits. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 28, 71–8.
- Kratzberg J.A., Walker P.J., Rikkers E., Raghavan M.L., 2009. The effect of proteolytic treatment on plastic deformation of porcine aortic tissue. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2 (1), 65–72.
- Kuhlencordt P.J., Gyurko R., Han F., Scherrer Crosbie M., Aretz T.H., Hajjar R., Picard M.H., Huang P.L., 2001. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 104, 448–454.
- Laborde J.C., Parodi J.C., Clem M.F., Tio F.O., Barone H.D., Rivera F.J., Encarnacion C.E., Palmaz J.C., 1992. Intraluminal bypass of abdominal aortic aneurysm: feasibility study. *Radiology* 184 (1), 185–190.
- Lederle F.A., Johnson G.R., Wilson S.E., Chute E.P., Littooy F.N., Bandyk D., Krupski W.C., Barone G.W., Acher C.W., Ballard D.J., 1997. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann. Intern. Med.* 126, 441–449.
- Lindholt J.S., Erlandsen E.J., Henneberg E.W., 2001. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* 88, 1472–1475.
- Mäki J.M., Räsänen J., Tikkanen H., Sormunen R., Mäki-Kallio K., Kivirikko K.I., Soininen R., 2002. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 106 (19), 2503–2509.
- Manning M.W., Cassi L.A., Huang J., Szilvassy S.J., Daugherty A., 2002. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc. Med.* 7 (1), 45–54.
- Marinov G.R., Marois Y., Pâris E., Roby P., Formichi M., Douville Y., Guidoin R., 1997. Can the infusion of elastase in the abdominal aorta of the Yucatán miniature swine consistently produce experimental aneurysms? *J. Invest. Surg.* 10 (3), 129–150.
- Matsumura J.S., Moore W.S., 1998. Clinical consequences of periprosthetic leak after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. Endovascular Technologies Investigators. *J. Vasc. Surg.* 27, 606–13.
- Maynar M., Qian Z., Hernandez J., Sun F., DeMiguel C., Crisostomo V., Usón J., Pineda L.F., Espinoza C.G., Castañeda W.R., 2003. An animal model of abdominal aortic aneurysm created with peritoneal patch: technique and initial results. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 26 (2), 168–176.
- McKenzie J.E., Scandling D.M., Ahle N.W., Bryant H.J., Kyle R.R., Abbrecht P.H., 1996. Effects of soman (pinacolyl methylphosphonofluoridate) on coronary blood flow and cardiac function in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* 29, 140–6.
- Moláček J., Treska V., Kobr J., Certík B., Skalický T., Kuntscher V., Krízková V., 2009. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm-experiment in an animal model. *J. Vasc. Res.* 46 (1), 1–5.

- Moll F.L., Powell J.T., Fraedrich G., (eds.), 2011. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 41, 1–58.
- Palmaz J.C., Tio F.O., Laborde J.C., Clem M., Rivera F.J., Murphy K.D., Encarnacion C.E., 1995. Use of stents covered with polytetrafluoroethylene in experimental abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 6 (6), 879–85.
- Parodi J.C., Barone A., Piraino R., Schonholz C., 1997. Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms: lessons learned. *J. Endovasc. Surg.* 4, 102–10.
- Pearce W.H., Koch A.E., 1996. Cellular components and features of immune response in abdominal aortic aneurysms. *Ann. NY Acad. Sci.* 800, 175–85.
- Petersen E., Gineitis A., Wagberg F., Angquist K.A., 2000. Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20, 457–461.
- Pleumeekers H.J., Hoes A.W., van der Does E., van Urk H., Hofman A., de Jong P.T., Grobbee D.E., 1995. Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 142, 1291–1299
- Powell J., 1991. Models of arterial aneurysm: for the investigation of pathogenesis and pharmacotherapy – a review. *Atherosclerosis.* 87, 93–102.
- Prescott M.F., Sawyer W.K., Von Linden-Reed J., Jeune M., Chou M., Caplan S.L., Jeng A.Y., 1999. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 878, 179–190.
- Pyo R., Lee J.K., Shipley J.M., Curci J.A., Mao D., Ziporin S.J., Ennis T.L., Shapiro S.D., Senior R.M., Thompson R.W., 2000. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* 105, 1641–1649.
- Quigley M.R., Heiferman K., Kwaan H.C., Vidovich D., Nora P., Cerullo L.J., 1987. Laser-sealed arteriotomy: a reliable aneurysm model. *J Neurosurg.* 67 (2), 284–287
- Raman V.K., Karmarkar P.V., Guttman M.A., Dick A.J., Peters D.C., Ozturk C., Pessanha B.S., Thompson R.B., Raval A.N., DeSilva R., Aviles R.J., Atalar E., McVeigh E.R., Lederman R.J., 2005. Real-time magnetic resonance-guided endovascular repair of experimental abdominal aortic aneurysm in swine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (12), 2069–2077.
- Sadek M., Hyneccek R.L., Goldenberg S., Kent K.C., Marin M.L., Faries P.L., 2008. Gene expression analysis of a porcine native abdominal aortic aneurysm model. *Surgery* 144 (2), 252–258.
- Schonbeck U., Sukhova G.K., Gerdes N., Libby P., 2002. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am. J. Pathol.* 161, 499–506.
- Shibamura H., Olson J.M., van Vlijmen-Van Keulen C., Buxbaum S.G., Dudek D.M., Tromp G., Ogata T., Skunca M., Sakalihasan N., Pals G., i in., 2004. Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation.* 109, 2103–2108.
- Silence J., Collen D., Lijnen H.R., 2002. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ. Res.* 90, 897–903.
- Simpson C.F., Kling J.M., Palmer R.F., 1970. Beta-aminopropionitrile-induced dissecting aneurysms of turkeys: treatment with propranolol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16 (1), 143–153.
- Simpson C.F., Kling J.M., Robbins R.C., Harms R.H., 1968. Beta-aminopropionitrile-induced aortic ruptures in turkeys: inhibition by reserpine and enhancement by monoamine oxidase inhibitors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 12 (1), 48–59.
- Singh P.K., Marzo A., Howard B., Rufenacht D.A., Bijlenga P., Frangi A.F., Lawford P.V., Coley S.C., Hose D.R., Patel U.J., 2010. Effects of smoking and hypertension on wall shear stress and

- oscillatory shear index at the site of intracranial aneurysm formation. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 112, 306–13.
- Skold B.H., Getty R., Ramsey F.K., 1966. Spontaneous atherosclerosis in the arterial system of aging swine. *Am. J. Vet. Res.* 27, 257–273.
- Springer F., Schlierf R., Pfeffer J.G., Mahnken A.H., Schnakenberg U., Schmitz-Rode T., 2007. Detecting endoleaks after endovascular AAA repair with a minimally invasive, implantable, telemetric pressure sensor: an *in vitro* study. *Eur. Radiol.* 17, 2589–2597.
- Strindberg G., Nichols P., Ricci M.A., Marinov G., Marois Y., Roby P., Guidoin R., 1998. Experimental modifications to a canine infrarenal aortic aneurysm model for the validation of endovascular stent-grafts: an exploratory study. *J. Invest. Surg.* 11, 185–197.
- Swindle M.M., Smith A.C., Hepburn B.J., 1988. Swine as models in experimental surgery. *J. Invest. Surg.* 1, 65–79.
- Tanaka A., Hasegawa T., Chen Z., Okita Y., Okada K., 2009. A novel rat model of abdominal aortic aneurysm using a combination of intraluminal elastase infusion and extraluminal calcium chloride exposure. *J. Vasc. Surg.* 50 (6), 1423–1432.
- Tangirala R.K., Rubin E.M., Palinski W., 1995. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid. Res.* 36 (11), 2320–2328.
- Tchougounova E., Lundequist A., Fajardo I., Winberg J.O., Abrink M., Pejler G., 2005. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and pro-matrix metalloproteinase-2. *J. Bio. Chem.* 280, 9291–9296.
- Thompson M.M., Bell P.R., 2000. ABC of arterial and venous disease. Arterial aneurysms. *Br. Med. J.* 320, 1193–1196.
- Thompson R.W., Curci J.A., Ennis T.L., Mao D., Pagano M.B., Pham C.T., 2006. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. *Ann. NY Acad. Sci.* 1085, 59–73.
- Tierney A.P., Dumont D.M., Callanan A., Trahey G.E., McGloughlin T.M., 2010. Acoustic radiation force impulse imaging on *ex vivo* abdominal aortic aneurysm model. *Ultrasound. Med. Biol.* 36, 821–832.
- Tsui J.C., 2010. Experimental models of abdominal aortic aneurysms. *Open Cardiovasc. Med. J.* 26 (4), 221–230.
- Tsuruda T., Kato J., Hatakeyama K., Kojima K., Yano M., Yano Y. (eds.), 2008. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ. Res.* 102, 1368–1377.
- Verbin C., Donayre C., Kopchok G., Scocciati M., White R.A., 1995. Anterior patch aortic aneurysm model for the study of endoluminal grafts. *J. Invest. Surg.* 8 (5), 381–388.
- Volodos S.M., Sayers R.D., Gostelow J.P., Bell P., 2003. Factors affecting the displacement force exerted on a stent graft after AAA repair—an *in vitro* study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 26, 596–601.
- Vos A.W., Linsen M.A., Wisselink W., Rauwerda J.A., 2004. Endovascular grafting of complex aortic aneurysms with a modular side branch stent-graft system in a porcine model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 27 (5), 492–497.
- Wanhainen A., Therasse R., Ahlström H., Lind L., Johansson L., 2008. Thoracic and abdominal aortic dimension in 70-years old men and women: a population-based whole-body MRI study. *J. Vasc. Surg.* 47, 504–512.
- White G.H., Yu W., May J., Chaufour X., Stephen M.S., 1997. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms: classification, incidence, diagnosis, and management. *J. Endovasc. Surg.* 4, 152–168.

- White J.V., Mazzacco S.L., 1996. Formation and growth of aortic aneurysms induced by adventitial elastolysis. *Ann. NY Acad. Sci.* 800, 97–120.
- Whitbread T., Birch P., Rogers S., Majeed A., Rochester J., Beard J.D., Gaines P., 1996. A new animal model for abdominal aortic aneurysms: initial results using a multiple-wire stent. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 11 (1), 90–97.
- Wills A., Thompson M.M., Crowther M., Brindle N.P., 1996. Elastase-induced matrix degradation in arterial organ cultures: An *in vitro* model of aneurysmal disease. *J. Vasc. Surg.* 24, 667–679.
- Wolski A., Korobowicz E., Siezieniewska Z., Mazur E., Niedźwiadek J., Koziol-Montewka M., Michalak J., 2002. Immunofluorescence in situ and the serologic indices of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with an abdominal aortic aneurysm. *Pol. J. Pathol.* 53, 223–228.
- Yamanouchi D., Morgan S., Stair C., Seedial S., Lengfeld J., Kent K.C., Liu B., 2012. Accelerated aneurysmal dilation associated with apoptosis and inflammation in a newly developed calcium phosphate rodent abdominal aortic aneurysm model. *J. Vasc. Surg.* [Epub ahead of print].
- Zhang S.H., Reddick R.L., Piedrahita J.A., Maeda N., 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 258, 468–471.
- Zollikofer C.L., Redha F.H., Bruhlmann W.F., Uhlschmid G.K., Vlodayer Z., Castaneda-Zuniga W.R., Amplatz K., 1987. Acute and long-term effects of massive balloon dilation on the aortic wall and vasa vasorum. *Radiology* 164 (1), 145–149.

Acknowledgment

This publication is part of a project entitled "Wrovasc – Integrated Cardiovascular Centre", co-financed by the European Regional Development Fund as part of the Innovative Economy Operational Programme, 2007–2013: "European Funds for the development of an innovative economy".

EXPERIMENTAL METHODS OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM CREATION WITH PARTICULAR EMPHASIS ON SWINE AS A LARGE ANIMAL MODEL

Abstract. Abdominal aortic aneurysm (AAA) is on the 10th position of the causes of death in men above 55 years of age. Method of treatment of AAA measuring above 5,5 cm is the classical surgery or endovascular procedure. Death and complication rates associated with surgery are still high. For this reason further studies on pathogenesis, pathophysiology and treatment of abdominal aortic aneurysm are needed. Numerous animal models of AAA have been developed. Research is conducted on predisposed animals and on models, in which AAA have been induced by chemical or physical methods. Swine are good experimental model for the improvement of new surgical techniques. Many physical protocols are used to produce aneurysm in swine (especially operational), combinations of physical and chemical methods are also introduced and constantly improved.

Key words: abdominal aortic aneurysm (AAA), large animal model, swine, aneurysm creation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

For citation – Do cytowania: Czerski A., Bujok J., Rusiecka A., Zawadzki W., Gnus J., Hauser W., Ratajczak K., Witkiewicz W., 2011. Eksperymentalne metody wywoływania tętniaków aorty brzusznej ze szczególnym uwzględnieniem świni jako dużego modelu zwierzęcego, *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 10 (4), 5–22.

WPLYW NIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH N-3 I N-6 NA METABOLIZM TKANKI KOSTNEJ

Dorota Graboś, Anna Gawłowska

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Kości są aktywną metabolicznie tkanką podlegającą trwającemu przez całe życie procesowi modelowania. Metabolizm kości kontrolują czynniki systemowe, jak również i lokalne, a znaczącą rolę ogrywa także odpowiednio zbilansowana dieta. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WKT) budzą zainteresowanie jako naturalne substancje, które mogą oddziaływać na komórki tkanki kostnej modyfikując ich metabolizm. Są one prekursorami eikozanoidów, które uczestniczą w wielu mechanizmach regulacyjnych. Przy udziale COX powstają prostaglandyny, prostacykliny i tromboksany, natomiast pod wpływem LOX leukotrieny.

Z kwasu arachidonowego (AA) pod wpływem COX powstaje m.in. PGE₂, która pośredniczy w oddziaływaniu na tkankę kostną hormonów kalcytropowych, cytokin proresorbcyjnych i czynników wzrostu. Prawidłowa suplementacja ogranicza działanie AA, czego skutkiem jest obniżenie poziomu PGE₂, a tym samym osłabienie intensywności zmian zanikowych tkanki kostnej. W świetle przeprowadzonych badań dotyczących leczenia, a przede wszystkim profilaktyki, suplementacja diety WKT odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie tkanki kostnej zwierząt i ludzi.

Słowa kluczowe: osteoporoza, nienasycone kwasy tłuszczowe, tkanka kostna, PGE₂

W ostatnich latach poświęca się wiele uwagi wpływowi na organizm wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WKT). Najwięcej badań dotyczy chorób sercowo-naczyniowych tj.: migotanie przedsionków, niewydolność serca, udary mózgu, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna. Kardioprotekcyjne działanie tych kwasów znane jest już od ponad 70 lat, ciągle jednak odkrywane są nowe właściwości, które można wykorzystać w suplementacji diety kobiet ciężarnych, osób z chorobą Alzheimera i cukrzycy. Ostatnie

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Dorota Graboś, Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin, email: dorotagrabos@interia.pl

badania dowiodły, iż WKT mają również wpływ na układ kostny u ludzi, jak i u zwierząt przy czym nie jest on do końca jednoznaczny [Watkins i in. 2005, 2006, Shen i in. 2006]. W związku z powyższym, w niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów działania i wpływu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a także ich metabolitów na metabolizm i właściwości tkanki kostnej u ludzi i zwierząt oraz potencjalnych możliwości ich wykorzystania w prewencji schorzeń metabolicznych kości.

Z punktu widzenia prewencji chorób cywilizacyjnych na szczególną uwagę zasługują kwasy n-3 i n-6. Związkiem zapoczątkowującym serię kwasów n-3 jest kwas α -linolenowy (ALA C18:3), a kwasów n-6 kwas linolowy (LA C18:2) [Caldwell i in. 1972]. W wątrobie, jak również w niewielkich ilościach w innych tkankach, ulegają one przemianom katalizowanym przez wiele enzymów, co powoduje wydłużanie łańcucha i tworzenie wiązań podwójnych. W torze przemian kwasów n-3 są kwasy: eikozapentaenowy (EPA C20:5), kwas dokozapentaenowy (DPA C22:5) oraz kwas dokozaheksaenowy (DHA C22:6). W organizmie z ALA na drodze elongacji i desaturacji zachodzi synteza EPA i DHA. Z LA natomiast pod wpływem desaturazy powstaje kwas gamma-linolenowy (GLA C18:3), który jest wydłużany do kwasu dihomogamma-linolenowego (DGLA C20:3), ulegającego desaturacji do kwasu arachidonowego (AA C20:4) [Archemowicz i Szary-Szwost 2005]. Z uwagi na fakt, iż w metabolizmie kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 uczestniczą te same układy enzymatyczne spożywanie dużych ilości LA powoduje zmniejszenie syntezy EPA i DHA, a nasilenie syntezy AA. Z drugiej strony spożycie dużych ilości ALA osłabia syntezę AA i stymuluje wytwarzanie EPA i DHA [Claassen i in. 1995].

Ssaki nie mają jednakże zdolności syntetyzowania kwasu linolowego i linolenowego, dlatego muszą być one dostarczane z pożywieniem. Ich źródłem mogą być oleje pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Oleje z ziaren zbóż bogate są w kwas linolowy, natomiast oleje z warzyw zielonych w kwas α -linolenowy (tab. 1). Naturalnym, bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 są oleje rybne (tab. 2). Zawartość EPA i DHA oraz ich wzajemne proporcje w tłuszczu rybnym zależą od gatunku i stanu fizjologicznego ryb, pory roku oraz akwenu połowu, np. ryby z zimnych mórz północnych zawierają więcej EPA, z południowych zaś więcej DHA [Archemowicz i Szary-Szwost 2005].

Wielonienasycone długołańcuchowe kwasy tłuszczowe pod wpływem fosfolipazy A₂ są uwalniane z fosfolipidów błon komórkowych i wchodzi w reakcje z udziałem jednego z dwóch grup enzymów: cyklooksygenazą (COX) lub lipooksygenazą (LOX). Przy udziale COX powstają prostaglandyny, prostacykliny i tromboksany, a pod wpływem LOX leukotrieny. Powyższe związki są swoistymi przekaźnikami, które wzmacniają lub osłabiają regulacyjną rolę hormonów i neuromediatorów [Burdan i in. 2006]. Związkiem macierzystym dla prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów monoenowych (PGE₁, PGF₁, TXA₁) jest DGLA, dienowych (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂, TXA₂) – AA, a trienowych (PGD₃, PGE₃, PGF₃, PGI₃, TXA₃) – EPA. Pod wpływem LOX z AA powstają leukotrieny serii 4, a z EPA leukotrieny serii 5. Szlak syntezy prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów współzawodniczy o substraty ze szlakiem syntezy leukotrienów, zaś typ oraz ilość powstających związków zależą od dostępności substratów, aktywności fosfolipazy A₂, COX i LOX. W ocenie niektórych eikozanoidy będące pochodnymi AA cechują się większą aktywnością biologiczną niż pochodne EPA i DGLA [Watkins i in. 2001].

Tabela 1. Zawartość procentowa wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 w wybranych olejach roślinnych [%]

Table 1. The percentage content of polyunsaturated fatty acids n-3 and n-6 in selected vegetable oils

Oleje Oils	kwasy tłuszczowe n-3 n-3 fatty acids	kwasy tłuszczowe n-6 n-6 fatty acids
Olej z siemienia lnianego Flax oil	52,7	16,2
Olej sojowy Soybean oil	3,0	47,3
Olej rzepakowy Rapeseed oil	9,7	21,3
Olej kukurydziany Corn oil	0,7	60,2
Olej słonecznikowy Sunflower oil	0,0	66,7
Olej lniankowy Camelina oil	35,5	17,0
Olej arachidowy Peanut oil	0,0	75,4
Olej oliwkowy Olive oil	0,6	8,3

Tabela 2. Zawartość kwasów n-3 w wybranych gatunkach ryb [g/100 g produktu]

Table 2. The content of n-3 fatty acids in selected fish species [g/100 g of product]

Gatunek ryby Fish species	kwasy tłuszczowe n-3 n-3 fatty acids
Łosoś atlantycki Salmon	1,4–1,9
Śledź Herring	1,2–1,7
Sardynki Sardines	1,4
Makrela Mackerel	1,0–2,5
Pstrąg Trout	0,7–1,0
Halibut Halibut	0,4
Flądra Flounder	0,4
Tuńczyk z puszki Tuna	0,7–1,0

W metabolizmie tkanki kostnej największe znaczenie mają prostaglandyny serii 2, powstające w osteocytach i osteoblastach z kwasu arachidonowego przy udziale COX [Burdan i in. 2006]. PGE₂ pośredniczy w oddziaływaniach na tkankę kostną hormonów kalcytropowych, cytokin proresorbcyjnych – TNF α (czynnik martwicy nowotworu α), IL-1 (interleukina-1), IL-3 (interleukina-3), IL-6 (interleukina-6) i czynników wzrostu – TGF- β (transformujący czynnik wzrostu β), PDGF (płytkowy czynnik wzrostu), bFGF (czynnik wzrostu fibroblastów), a jej wpływ ma charakter dawkozależny [Watkins i in. 2005]. Mianowicie jej niskie stężenia, np. przy obciążeniach mechanicznych, mają anaboliczny wpływ na masę kostną [Cohen i in. 2005], stymulują proliferację osteoblastów i syntezę kolagenu [Raisz i Fall 1990]. PGE₂ podawana w niewielkiej ilości (3 mg/kg m. c./dzień) [Yao i in. 1999] stymuluje kościotworzenie w obrębie trzonu kości piszczelowej szczurów, a w przypadku owariektomizowanych szczurów powoduje z jednej strony zwiększenie masy kości korowej, a z drugiej nasila jej przebudowę. Wysoka dawka PGE₂ (6 mg/kg m. c./dzień) sprzyja natomiast resorpcji tkanki kostnej [Jee i in. 1990].

Badania *in vivo* i *in vitro* wskazują, że PGE₂ pełni integracyjną funkcję regulacyjną w odniesieniu do powstawania i funkcji zarówno osteoblastów, jak i osteoklastów. Osteoblasty syntetyzują i uwalniają RANKL (ligand receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- κ B) oraz M-CSF (czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów), pod wpływem których dochodzi do pobudzenia komórek prekursorowych osteoklastów z linii makrofagów lub monocytów, a następnie do ich różnicowania i fuzji w wielojądrzaste osteoklasty. RANKL po połączeniu z receptorem aktywującym jądrocy czynnik NF- κ B (RANK) na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów wyzwala kaskadę sygnałową wewnątrz komórki dojrzewającego osteoklastu. Istotną rolę w tych procesach odgrywa COX-2, która katalizuje syntezę PGE₂ z kwasu arachidonowego. Wzrost syntezy PGE₂ skutkuje wzrostem poziomu RANK i jednocześnie hamowaniem syntezy osteoprotegryny (OPG) [Liu i in. 2006, Męczekalski i Czyżyk 2009]. OPG, syntetyzowana głównie przez osteoblasty, należy do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów. Mając zdolność wiązania RANKL, uniemożliwia jego wiązanie z RANK i w konsekwencji zapobiega różnicowaniu prekursorów osteoklastów [Kosteniuk i Shalhoub 2001]. PGE₂ zwiększając ekspresję zarówno RANKL, jak i RANK oraz hamując ekspresję OPG, działa proresorpcyjnie, wzmagając aktywność osteoklastów. Podobny wpływ na tkankę kostną wykazują leukotrieny, będące metabolitami lipooksygenazy, które jako lokalne regulatory stymulują resorpcję kości, jak również hamują jej tworzenie [Traianedes i in. 1998, Laufer 2003, Jiang i in. 2005]. W doświadczeniach Meghji i in. [1988] oraz Trainanedes i in. [1998] stymulacja resorpcji kości i aktywacja osteoklastów *in vitro* zachodziła pod wpływem leukotrienów B4 (LTB4), jak i C4 (LTC4) i D4 (LTD4).

PGE₂ bierze również udział w stymulacji osteoblastogenezy poprzez aktywację szlaku sygnałowego *Wnt*, zwiększenie ekspresji IGF-1 oraz czynnika transkrypcyjnego *Cbfa-1* [Guan i in. 2002, Yoshida i in. 2002, Watkins i in. 2003, Celil i Campbell 2005, Bonewald 2006]. Z drugiej strony wykazano, iż WKT mogą hamować ekspresję *Cbfa-1*, a tym samym różnicowanie osteoblastów i proces osteoblastogenezy [Watkins i in. 2003].

Insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFs), będące głównymi czynnikami wzrostu pochodzącym z kości, uwalniane są z macierzy kostnej podczas osteoklastycznej resorpcji kości i działając na drodze auto- i parakrynej stymulują kościotworzenie. Relacje między prostaglandynami a insulinopodobnymi czynnikami wzrostu mają bardzo duże znaczenie w utrzymaniu homeostazy tkanki kostnej i odpowiedniej masy podczas kry-

tycznych etapów wzrostu i rozwoju szkieletu oraz podczas starzenia [Massicotte i in. 2006]. Jak wynika z badań Watkins'a i in. [1997] i Li i in. [1999] podawanie kurczętom i szczurom WKT n-3 wpływa na syntezę PGE₂ i stężenie IGF-1, czego wynikiem jest nasilenie procesu kościotworzenia. W innych badaniach przy wzbogaceniu diety w DHA lub mieszankę DHA i EPA również można było zaobserwować wzrost poziomu IGF-1 [Shen i in. 2006, Poulsen i in. 2007]

Literatura ostatnich lat zawiera sporo doniesień o badaniach *in vivo* i *in vitro* dotyczących wpływu WKT na właściwości i metabolizm tkanki kostnej, przy czym w opisywanych układach doświadczalnych wykorzystuje się zarówno oleje roślinne i zwierzęce o różnej zawartości kwasów n-3 i n-6, jak również poszczególne nienasycone kwasy tłuszczowe. Wpływ mieszaniny kwasu γ -linolenowego (GLA) i EPA badali Kruger i in. [1998], podając ją kobietom w podeszłym wieku. Po 18 miesiącach doświadczenia zaobserwowali protekcyjny wpływ zastosowanych kwasów na tkankę kostną objawiający się wzrostem gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa. Podobne pozytywne oddziaływanie na BMD zaobserwowali Classen i in. [1995] oraz Haag i in. [2003], natomiast brak wpływu na parametry densytometryczne tkanki kostnej diety zawierającej kwasy n-3 stwierdzili Bassey i in. [2000], Dodin i in. [2005] oraz Appleton i in. [2011].

Odzwierciedleniem zmian zachodzących w kościach są markery jej metabolizmu określone we krwi i moczu, jednakże uzyskiwane w tym zakresie wyniki są rozbieżne. U kobiet po menopauzie ze stwierdzoną osteoporozą, którym podawano codziennie w diecie przez 16 tygodni 4 g oleju rybiego, zawierającego mieszankę kwasów EPA i DHA oraz oleju rybiego z olejem z wiesiołka (60% LA, 8% GLA, 4% EPA, 3% DHA) zaobserwowano np. zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej oraz wzrost stężenia prokolagenu w surowicy, czemu towarzyszył wzrost poziomu w osoczu osteokalcyny, specyficznego niekolagenowego białka, które jest uwalniane do krwi zarówno przy tworzeniu nowej tkanki kostnej, jak i podczas procesu przebudowy tkanki kostnej [Watkins i in. 2001]. Powyższe wyniki nie są jednoznaczne, gdyż wzrost w osoczu poziomu prokolagenu ma miejsce przy tworzeniu nowych włókien kolagenowych podczas procesów kościotworzenia [Das 2000], zaś zmniejszenie poziomu fosfatazy zasadowej wskazuje na zmniejszenie tempa mineralizacji kości. Natomiast Griel i wsp. [2007] wykazali, iż wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie obniża poziom wskaźnika resorpcji kości, jakim jest NTx (N-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha kolagenu typu I), pozostając bez wpływu na poziom fosfatazy zasadowej. Przy czym redukcja poziomu NTx była większa przy diecie z dużą zawartością ALA (n-6/ n-3 1,6:1), zaś mniejsza przy diecie z dużą zawartością LA (n-6/ n-3 3.5:1). Brak wpływu na poziom markerów metabolizmu kostnego zaobserwowali z kolei Sharif i in. [2010].

Znacznie więcej badań z zakresu wpływu nienasyconych kwasów tłuszczowych na metabolizm tkanki kostnej prowadzonych jest na zwierzętach. Udowodniono m.in. że podawanie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych samicom szczurów w fazie końcowej ciąży i laktacji, przy wcześniejszym niedoborze tych kwasów, powoduje wzrost masy ciała i zawartości mineralnej kości (BMC) u noworodka [Bassey i in. 2000]. Zwiększenie gęstości mineralnej kości udowej przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu osteokalcyny w osoczu rosnących szczurów przy 7% suplementacji kwasami n-3 wykazali Green i in. [2004]. Pozytywny wpływ na tkankę kostną rosnących szczurów i myszy zaobserwowali również Li i in. [2010] oraz Lau i in. [2009]. Prosięta, którym podawano niewielkie ilości AA i DHA również wykazywały wzrost

masy kostnej, zaś u zwierząt spożywających 1,2 g/100 g tłuszczu i 2,4 g/100 g tłuszczu obserwowano mniej korzystne efekty [Korotkova i in. 2003]. W dostępnej literaturze są również badania wskazujące na niekorzystny wpływ WKT na tkankę kostną rosnących zwierząt [Basse i in. 2000, Dodin i in. 2005], co świadczy o tym, iż nie tylko rodzaj kwasów tłuszczowych zawartych w diecie, ale również wielkość suplementacji oraz stosunek n-3 do n-6 ma duże znaczenie dla jej metabolizmu [Classen i in. 1995, Kruger i in. 1998, Weiler i Fitzpatrick-Wong 2002, Watkins i in. 2006].

Liu i in. [2003] wykazali znacząco wyższe wartości BMC u przepiórek otrzymujących olej rybi (duża zawartość n-3) w porównaniu z grupą otrzymującą olej sojowy (duża zawartość n-6). Podobne wyniki zaobserwowali Sun i in. [2003] oraz Bhattacharya i in. [2005] u szczurów otrzymujących olej rybi w porównaniu ze szczurami otrzymującym olej kukurydziany. Cohen i in. [2005] stwierdzili, że rosnące myszy karmione paszą z 10% dodatkiem oleju lnianego (15% LA i 56% ALA, stosunek n-3 do n-6 4:1) wykazywały wzrost zawartości ALA, EPA, DHA w osoczu, z kolei po dodatku oleju kukurydzianego (57% LA i 1% ALA, stosunek n-3 do n-6 1:57) nastąpił spadek AA i LA w osoczu. Nie stwierdzono natomiast różnic w poziomie cytokin prozapalnych w obu grupach, jak również nie zaobserwowano istotnego wpływu dodatku oleju lnianego na biochemiczne markery metabolizmu kostnego oraz BMD. Watkins i in. [2006] w swoich badaniach u szczurów ze zniesioną funkcją hormonalną gonad stwierdzili, że stosunek kwasów tłuszczowych n-3 do n-6 w diecie równy 1:5 był bardziej korzystny niż stosunek 1:10. Z kolei Baird i in. [2008] nie zaobserwowali znaczących różnic w BMD i BMC u kurcząt otrzymujących paszę wzbogaconą w n-3 i n-6 w stosunku 1:47,8; 1:18; 1:7,6 oraz 1:4,7. Podobnie brak istotnych różnic w BMD i BMC przy różnym stosunku kwasów n-3 do n-6 stwierdził Johnston i in. [2006] u indyków.

Większość badań wskazuje jednak, iż dieta o niskim stosunku kwasów n-6 do n-3 wykazuje pozytywny wpływ na tkankę kostną i wspomaga utrzymanie gęstości mineralnej kości [Watkins i in. 2000, Albertazzi i Coupland 2002, Liu i in. 2003]. Duża zawartość kwasów n-6 w diecie może skutkować wysokim stosunkiem AA do EPA w kościach, czego efektem jest redukcja kościotworzenia i nasilenie procesów resorpcyjnych poprzez wzrost syntezy i uwalniania PGE_2 . Wzrost konsumpcji kwasów n-3 obniża natomiast zawartość AA, efektem czego jest zmniejszenie stosunku AA do EPA, obniżenie poziomu PGE_2 , a tym samym redukcja aktywności osteoklastów. EPA jest prekursorem prostaglandyn serii 3, które również stymulują resorpcję tkanki kostnej, jednak jego konwersja do PGE_3 jest znacznie mniej efektywna niż AA do PGE_2 [Watkins i in. 2000, Watkins i in. 2003].

Przejawem inhibicyjnego wpływu długołańcuchowych WKT n-3 na osteoklastogenezę i resorpcję tkanki kostnej jest również hamowanie aktywacji NF- κ B [Sun i in. 2003] i RANKL [Rahman i in. 2005] oraz obniżenie aktywności winianoopornej kwasnej fosfatazy (enzymu uczestniczącego w resorpcji tkanki kostnej), poziomu TNF- α , IL-2, INF- γ [Sun i in. 2003]. O korzystniejszym wpływie kwasów n-3 na tkankę kostną świadczą także: redukcja poziomu NO w kościach, wzrost poziomu w osoczu krwi IGF-1 oraz aktywności fosfatazy zasadowej przy jednoczesnym obniżeniu wydalania z moczem markerów resorpcji kości pirydynoliny i wapnia [Shen i in. 2006]. W związku z powyższym odpowiednia suplementacja diety pod względem zawartości kwasów n-3 i n-6 może osłabiać intensywność zmian zanikowych tkanki kostnej [Watkins i in. 1996, 2000, 2003, Liu i Denbow 2001, Albertazzi i Coupland 2002, Liu i in. 2003, Poulsen i in. 2007].

Jak wykazują badania, najczęstszą przyczyną rozwoju metabolicznych chorób zanikowych układu kostnego zwierząt i ludzi jest spadek poziomu estrogenów, u podłoża którego leżą wiek lub gonadektomia podyktowana względami medycznymi czy hodowlanymi. Estrogeny odgrywają kluczową rolę we wzroście i utrzymaniu masy kostnej, a ich działanie ma charakter wielokierunkowy. Procesy te realizowane są poprzez stymulację dojrzewania płytki wzrostowej, pobudzanie osteoblastogenezy i mineralizacji, a w efekcie zwiększanie wytrzymałości kości. Oddziaływanie estrogenów przejawia się również w ich regulacyjnym wpływie na syntezę cytokin prozapalnych – IL-1, IL-6 oraz TNF- α – pobudzających resorpcyjną aktywność osteoklastów [Veldhuis i in. 2005]. W momencie zmniejszenia aktywności hormonalnej gonad obserwuje się zwiększenie stężenia tych cytokin, jak również RANKL. Cytokiny prozapalne mogą mieć negatywny wpływ na kości przez stymulację resorpcji dwiema drogami: poprzez zwiększenie proliferacji i aktywacji osteoklastów lub przez stymulację osteoblastów do uwalniania RANKL [Poulsen i in. 2007]. Stwierdzono również, iż wpływają one hamująco na proliferację chondrocytów i powodują degradację chrząstki stawowej [Nietfeld i in. 1990]. Podawanie owariektomizowanym szczurzycom w diecie długołańcuchowych kwasów n-3, EPA i DHA, z dodatkiem lub nie kwasów n-6, powoduje natomiast hamowanie ekspresji RANKL, osłabienie syntezy cytokin prozapalnych, a w efekcie redukcję resorpcji kości oraz utrzymanie BMC na odpowiednim poziomie [Watkins i in. 2000, Green i in. 2004].

Estrogeny stymulują jelitową absorpcję wapnia oraz uczestniczą w utrzymaniu jego odpowiedniego poziomu w tkance kostnej. W przypadku ich braku następuje wzrost poziomu wapnia w surowicy oraz obniżenie wchłaniania jelitowego. WKT, a głównie EPA i DHA, zwiększają aktywność jelitowej Ca²⁺-ATPazy, a tym samym wchłanianie wapnia w jelitach, co wiąże się z mniejszym jego wydalaniem z kałem. Doświadczenia przeprowadzone na owariektomizowanych szczurach otrzymujących dietę bogatą w EPA i DHA wskazują na zmniejszenie ubytków tkanki kostnej, a w przypadku braku kalmoduliny – na wzrost aktywnego transportu wapnia w przewodzie pokarmowym [Coetzer i in. 1994, Haag 2003].

Dieta, płeć oraz wiek mają znaczący wpływ na metabolizm długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Czynnikiem hamującym ich konwersję są: wysokie spożycie sodu, niedobór biotyny, cukrzyca. Wraz z wiekiem zmienia ulega profil lipidów w błonach fosfolipidowych, jak również skład tkanki tłuszczowej – następuje wzrost zawartości AA, DPA i DHA, co jest silnie zaznaczone u osobników płci żeńskiej. Istnieją również różnice w poziomie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych we krwi, zależne od płci, co świadczy o wpływie hormonów płciowych na ich metabolizm. Zależności te tłumaczy się oddziaływaniem hormonów płciowych na aktywność układów enzymatycznych uczestniczących w konwersji ALA i LA. Postępujące wraz z wiekiem obniżenie poziomu hormonów płciowych i spadek aktywności enzymatycznej powodują zmiany w metabolizmie nienasyconych kwasów tłuszczowych i eikozanoidów, co prowadzi do zmian patologicznych tkanki kostnej [Poulsen i in. 2007].

Większość badań *in vivo* na ludziach i zwierzętach, jak i *in vitro* wskazuje na protekcyjny wpływ kwasów rodzin n-3 i n-6 na tkankę kostną. Odbywa się to najprawdopodobniej przez regulację syntezy cytokin oraz eikozanoidów, jak również przez wpływ na metabolizm wapnia. Zapobieganie zmianom zanikowym tkanki kostnej, objawiające się utrzymywaniem masy kostnej na stałym poziomie lub zmniejszaniem jej ubytków, bardzo często nie ma jednak odzwierciedlenia w poziomie markerów metabolizmu kostne-

go. Istnieje w związku z tym konieczność prowadzenia dalszych badań, które umożliwią określenie poziomu i profilu nienasyconych kwasów tłuszczowych w codziennej diecie, najbardziej korzystnych w procesach fizjologicznych tkanki kostnej.

LITERATURA

- Achremowicz K., Szary-Sworst K., 2005. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka. *Nauka Technologia Jakość*, 3, 23–35.
- Albertazzi P., Coupland K., 2002. Polyunsaturated fatty acids: is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention. *Maturitas*, 42, 13–22.
- Appleton K.M., Fraser W.D., Rogers P.J., Ness A.R., Tobias J.H., 2011. Supplementation with a low-moderate dose of n-3 long-chain PUFA has no short-term effect on bone resorption in human adults. *Br. J. Nutr.* 105, 1145–1149.
- Baird H.T., Eggett D.L., Fullmer S., 2008. Varying ratios of omega-3:omega-6 fatty acids on the pre- and postmortem bone mineral density, bone ash and bone breaking strength of laying chicken. *Poultry Sci.*, 87, 323–328.
- Bassey E., Littlewood J., Rothwell M., Pye D., 2000. Lack of effect of supplementation with essential fatty acids on bone mineral density in healthy pre- and post-menopausal women: two randomized controlled trials of Efacalt v. calcium alone. *Br. J. Nutr.*, 83, 629–635.
- Bhattacharya A., Fernandes G., Ebersole J.L., 2005. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J. Dent. Res.*, 85, 648–652.
- Bonewald L., 2006. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision* 3, 7–15.
- Burdan F., Chałas A., Szumiło J., 2006. Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 60, 129–141.
- Caldwell M.D., Johansson H.T., Othersen H.B., 1972. Essential fatty acid deficiency in an infant receiving prolonged parenteral alimentation. *J. Pediatr.*, 81, 894–898.
- Celil A.B., Campbell P.G., 2005. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 280, 31353–31359.
- Claassen N., Coetzer H., Steinmann C., Kruger M., 1995. The effect of different n-6/n-3 essential fatty acid ratios on calcium balance and bone in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 53, 13–19.
- Coetzer H., Claassen N., van Papendorp D.H., Kruger M.C., 1994. Calcium transport by isolated brush border and basolateral membrane vesicles: role of essential fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 50, 257–266.
- Cohen S.L., Moore A.M., Ward W.E., 2005. Flaxseed oil and inflammation-associated bone abnormalities in interleukin-10 knockout mice. *J. Nutr. Biochem.*, 16, 368–374.
- Das U.N., 2000. Essential fatty acids and osteoporosis. *Nutrition*, 16, 386–390.
- Dodin S., Lemay A., Jacques H., Legare F., Forest J.C., Masse B., 2005. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 1390–1397.
- Green K.H., Wong S.C.F., Weiler H.A., 2004. The effect of dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on femur mineral density and biomarkers of bone metabolism in healthy, diabetic and dietary-restricted growing rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 71, 121–130.
- Griel A.E., Kris-Etherton P.M., Hilpert K.F., Zhao G., West S.G., Corwin R.L., 2007. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutr. J.*, 6, 1–8.

- Guan Y.F., Zhang Y.H., Breyer M.D., 2002. The role of PPARs in the transcriptional control of cellular processes. *Drug News Perspect* 15, 147–154.
- Haag M., Magada O.N., Claassen N., Bohmer L.H., Kruger M.C., 2003. Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 423–429.
- Jee W.S., Mori S., Li X.J., Chan S., 1990. Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone*, 11, 253–266.
- Jiang J., Lv H.S., Lin J.H., Jiang D.F., Chen Z.K., 2005. LTB4 can directly stimulate human osteoclast formation from PBMC independent of RANKL. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 33, 391–403.
- Johnston N.P., Nash L.L., Maceda E., Davidson R.T., Armstrong A., 2006. Effect of feeding diets enriched with either omega-3 or omega-6 polyunsaturated fatty acids on bone characteristics of turkey breeder hens. *Word's Poult. Sci. J.*, 471, 119–124.
- Korotkova M., Ohlsson C., Hanson L.A., Strandvik B., 2003. Perinatal essential fatty acid deficiency affects weight and bone growth and mineralization in adult rats. *Pediatr. Res.* 53, 28A.
- Kosteniuk P.J., Shalhoub V., 2001. Osteoprotegerin: A physiological and pharmacological inhibition of bone resorption. *Current Pharma.* 7, 613–635.
- Kruger M., Coetzer H., de Winter R., Gericke G., van Papendorp D., 1998. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging Clin. Exp. Res.*, 10, 385–394.
- Lau B.Y.Y., Ward W. E., Kang Y.X., Ma D.W.L., 2009. Femur EPA and DHA are correlated with femur biomechanical strength in young fat-1 mice. *J. Nutr. Biochem.* 20, 453–461.
- Laufer S., 2003. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 15, 623–62.
- Li Y., Seifert M.F., Ney D.M., Grahn M., Grant A.L., Allen K.G., Watkins B.A., 1999. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *J Bone Miner. Res.*, 14, 1153–1162
- Li Y., Seifert M.F., Lim S.Y., Salem N., Watkins B.A., 2010. Bone mineral content is positively correlated to n-3 fatty acids in the femur of growing rats. *Br. J. Nutr.* 104, 674–685.
- Liu D., Denbow D.M., 2001. Maternal dietary lipids modify composition of bone lipids and ex vivo prostaglandin E2 production in early postnatal Japanese quail. *Poult. Sci.*, 80, 1344–1352.
- Liu D., Veit H.P., Wilson J.H., Denbow D.M., 2003. Long-term supplementation of various dietary lipids alters bone mineral content, mechanical properties and histological characteristics of Japanese quail. *Poult. Sci.* 5, 831–839.
- Liu X.H., Krishenbaum A., Yao S., Levine A.C., 2006. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1068, 225–233.
- Massicotte F., Fernandes J.C., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., 2006. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblast. *Bone*, 38, 333–341.
- Meghji S., Sandy J.R., Scutt A. M., Harvey W., Harris M., 1988. Stimulation of bone resorption by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Prostaglandins*, 36, 139–149.
- Męczekalski B., Czyżyk A., 2009. Konwencjonalna hormonalna terapia zastępcza w leczeniu osteoporozy. *Pol. Merk. Lek.* 157, 72–77.
- Nietfeld J.J., Wilbrink B., Helle M., Van Roy J.L.M., Den Otter W., Swaak A.J.G., Huber-Bruning O., 1990. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 33, 1695–1701.
- Poulsen R.C., Moughan P.J., Kruger M.C., 2007. Long-chain polyunsaturated fatty acids and the regulation of bone metabolism. *Exp. Biol. Med.*, 232, 1275–1288.

- Rahman M., Bhattacharya A., Banu J., Fernandes G., 2005. Reduced bone loss by docosahexaenoic acid (DHA) than eicosapentaenoic acid (EPA) in ovariectomised mice. *J. Bone Miner. Res.*, 20, 127.
- Raisz L.G., Fall P.M., 1990. Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology*, 126, 1654–59.
- Sharif P.S., Asalforouh M., Ameri F., Larijani B., Abdollahi M., 2010. The effect of n-3 fatty acids on bone biomarkers in Iranian postmenopausal osteoporotic women: a randomized clinical trial. *AGE* 32, 179–186.
- Shen C.L., Yeh J.K., Rasty J., Li Y., Watkins B.A., 2006. Protective effect of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on bone loss in gonad-intact middle-aged male rats. *Br. J. Nutr.*, 95, 462–468.
- Sun D., Krishnan A., Zaman K., Lawrence R., Bhattacharya A., Fernandes G., 2003. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1206–1216.
- Traianedes K., Dallas M.R., Garrett I.R., Mundy G.R., Bonewald L.F., 1998. 5-Lipoxygenase Metabolites Inhibit Bone Formation *in Vitro*. *Endocrinology*, 7, 1374–1384.
- Veldhuis J.D., Roemmich J.N., Richmond E.J., Rogol A.D., Lovejoy J.C., Sheffield-Moore M., Mauras N., Bowers C.Y., 2005. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocr. Rev.* 26, 114–46.
- Watkins B.A., Shen C.L., Allen K.G., Seifert M.F., 1996. Dietary n-3 and n-6 polyunsaturates and acetylsalicylic acid alter *ex vivo* PGE₂ biosynthesis, tissue IGF-I levels, and bone morphometry in chickens. *J. Bone Miner. Res.*, 11, 1321–1332.
- Watkins B.A., Shen C.L., Mc Murtry J.P., Xu H., Brain S.D., Allen L.G., Seifert M.F., 1997. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J. Nutr.*, 127, 1084–1091.
- Watkins B.A., Li Y., Seifer M.F., 2000. Dietary ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. *J. Nutr.*, 30, 2274–2284.
- Watkins B.A., Lippman H.E., Le Bouteiller L., Li Y., Seifert M.F., 2001. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog. Lipid Res.*, 40, 125–148.
- Watkins B., Li Y., Lippman H., Feng S., 2003. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68, 387–398.
- Watkins B.A., Reinwald S., Li Y., Seifert M.F., 2005. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFA on bone mass in ovariectomized rats. *J. Nutr. Biochem.*, 16, 479– 88.
- Watkins B.A., Li Y., Seifer M.F., 2006. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. *J. Nutr. Biochem.*, 17, 282–289.
- Weiler H.A., Fitzpatrick-Wong S.C., 2002. Modulation of essential n-6:n-3 fatty acid ratios alters fatty acid status but not bone mass in piglets. *J. Nutr.*, 132, 2667–2672.
- Yao W., Jee W.S.S., Zhou H., Lu J., Cui L., Staterberg R., Liang T., Ma Y., 1999. Anabolic effect of prostaglandin E2 on cortical bone of aged male rats comes mainly from modeling-dependent bone gain. *Bone*, 25, 697–702.
- Yoshida K., Oida H., Kobayashi T., Maruyama T., Tanaka M., Katayama T., Yamaguchi K., Segi E., Tsuboyama T., Matsushita M., Ito K., Ito Y., Sugimoto Y., Ushikubi F., Ohuchida S., Kondo K., Nakamura T., Narumiya S., 2002. Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99, 4580–4585.

THE EFFECT OF UNSATURATED FATTY ACIDS N-3 AND N-6 ON BONE TISSUE METABOLISM

Abstract. Bones are metabolically active tissues, which undergo a lifelong process of modeling. Bone metabolism is controlled by system factors as well as by local ones, besides balanced diet plays a significant role. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) raise an interest as natural substances that can affect bone cells and modify their metabolism. They are the precursors of eicosanoids which are involved in a number of regulatory mechanisms, among others, at the level of bone tissue. With the participation of COX there appear prostaglandins, prostacyclins and monoenes thromboxanes, while under the influence of LOX leukotrienes. From arachidonic acid (AA) under the influence of COX is formed PGE₂, which in turn mediates in the impact on calciotropic hormones bone tissue, proresorptive cytokines and growth factors. Adequate supplementation reduces the activity of AA resulting in a diminution of PGE₂ level, thereby weakening the intensity of atrophic changes in bone tissue. In the light of conducted research on the treatment and in particular on the prevention, PUFA diet supplementation plays a significant role in the metabolism of both animal and human bone tissue.

Key words: osteoporosis, polyunsaturated fatty acids, bone tissue, PGE₂

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Graboś D., Gawłowska A., 2011. Wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 na metabolizm tkanki kostnej. Acta Sci. Pol. Med. Vet. 10 (4), 23–34.

WPLYW ZASTOSOWANIA ALG MORSKICH I OLEJU RYBNEGO NA WYDAJNOŚĆ, SKŁAD MLEKA ORAZ PARAMETRY BIOCHEMICZNE KRWI KRÓW*

Robert Kupczyński, Witold Janeczek, Krystyna Pogoda-Sewerniak,
Michał Dziecioł, Marek Szołtysik, Wojciech Zawadzki

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Prezentowane badania dotyczyły wpływu stosowania w dawkach pokarmowych krów mlecznych będących w pierwszym okresie laktacji oleju rybnego z wątroby dorsza wraz z mikroalgami morskimi na wybrane parametry biochemiczne krwi i wydajność mleka. Olej rybny wraz z mikroalgami krowy otrzymywały od 7. dnia laktacji przez okres 8 tygodni, w ilości 1% suchej masy dawki pokarmowej. Zastosowane dodatki spowodowały zmniejszenie pobrania paszy, co z kolei doprowadziło do zmniejszonej wydajności mleka. Zaobserwowano również redukcję zawartości tłuszczu i białka w mleku. Zwiększona zawartość w dawce pokarmowej PUFA spowodowała wzrost stężenia triglicerydów, cholesterolu oraz kwasu β -hydroksymasłowego w surowicy krwi. Odnotowano również wzrost stężenia bilirubiny całkowitej, natomiast aktywność enzymów nie wskazywała na zaburzenie funkcjonalne wątroby.

Słowa kluczowe: krowy, olej rybny, mikroalgi morskie, profil metaboliczny krwi

WSTĘP

Niedobór energii występujący u krów mlecznych w okresie poporodowym uzupełniać można różnego rodzaju tłuszczami, takimi jak łój, oleje roślinne pochodzące z nasion roślin oleistych i tłuszczów odpadowych czy ostatnio oleje rybne [Elizalde i in. 1999, Dhiman i in. 2000, Nowak i Potkański 2000, Bauman i in. 2003, Shingfield i in. 2006, AbuGhazaleh i in. 2009]. Tłuszcze te mogą być podawane w różnych postaciach jako niechronione lub chronione. Te ostatnie, obojętne dla środowiska zwacza, stosuje się naj-

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

* Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr N N311 342637 finansowanego przez MNiSW

Adres do korespondencji – Corresponding author: Robert Kupczyński, Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. J. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, e-mail: robert.kupczyński@up.wroc.pl

częściej w postaci mydeł wapniowych kwasów tłuszczowych [Petit i in. 2004], nasion roślin oleistych poddawanych procesowi ogrzewania bądź ekstruzji [Dhiman i in. 2000], tłuszczów otoczkowanych [Castañeda-Gutiérrez i in. 2009] czy mikrokrystalizowanego oleju rybnego i lnianego [Carriquiry i in. 2008]. W ostatnich latach bardzo wiele badań dotyczyło również wpływu tłuszczów różnego pochodzenia na modyfikację składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka krów [Abu-Ghazaleh i in. 2002, Palmquist i Griinari 2006, Castañeda-Gutiérrez i in. 2009, Abu-Ghazaleh i in. 2009]. Bardziej efektywne niż oleje roślinne w modyfikacji składu i koncentracji kwasów tłuszczowych w mleku, w tym sprzężonego kwasu linolowego (CLA), okazały się oleje rybne [Donovan i in. 2000, Abu-Ghazaleh i in. 2002, 2003, 2009] lub oleju rybnego wraz z olejami roślinnymi bogatymi w kwas linolowy C_{18:2} n-6 [Abu-Ghazaleh i in. 2003, Whitlock i in. 2006]. Tego rodzaju modyfikacja diety krów wpływa na wzrost zawartości *trans*-11 C18:1 oraz wyższą endogenną syntezę *cis*-9, *trans*-11 CLA w gruczole mlekowym.

Innym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych mogą być algi morskie. [Boeckert i in. 2008, Kupczyński i in. 2011]. Pozyskiwane są one poprzez odławianie z wód powierzchniowych (makroalgi) lub na drodze hodowli (mikroalgi). Bogate są one w kwasy tłuszczowe z rodziny n-3, m.in. kwasu dokozaheksaenowego DHA, którego poziom waha się w granicach od 5,24 do 5,52%. W swoim składzie zawierają także węglowodany, białko, mikro- i makroelementy, β -karoteny, witaminę C i B₁₂ [Kupczyński i in. 2011]. Zastosowanie alg morskich badano w ujęciu ich wpływu na procesy fermentacji zachodzące w żwaczu oraz zmiany kwasów tłuszczowych mleka krów [Boeckert i in. 2007, Or-Rashid i in. 2008]. Nie oceniano natomiast ich wpływu na przemiany metaboliczne zachodzące w organizmach krów.

Celem badań była ocena wpływu stosowania w dawkach pokarmowych krów mlecznych będących w pierwszym okresie laktacji oleju rybnego z wątroby dorsza wraz z mikroalgami morskimi na wybrane parametry biochemiczne krwi w zakresie przemiany węglowodanowo-lipidowej i aktywności wybranych enzymów (AST, GGT, LDH). Oceniono również wpływ zastosowanych dodatków na kondycję krów, wydajność i skład mleka krów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, o średniej rocznej wydajności stada 9000 kg mleka za laktację. Do doświadczenia ścisłego wytypowano metodą analogów 16 krów, uwzględniając kolejność laktacji (50% stanowiły pierwiastki, zaś 50% wieloródki w 2. i 3. laktacji), stan fizjologiczny (7. dzień laktacji) oraz wydajność. Krowy utrzymywano na uwięzi i izolowano przestrzennie. Zwierzęta żywiono systemem TMR (Total Mixed Ration), który podawano dwa razy dziennie.

Wartość pokarmową dawki TMR dla krów opracowano według norm żywienia przeżuwaczy INRA 2007 [Strzetelski 2009]. Pasze poddano analizie chemicznej, określając zawartość: suchej masy, białka ogólnego, popiołu surowego, tłuszczu surowego, włókna surowego i frakcji włókna (ADF i NDF) zgodnie z obowiązującymi normami AOAC [2005]. Podany w tabeli 1 skład chemiczny i wartość pokarmowa dawek TMR nie uwzględniały dodatku oleju rybnego i alg morskich. Pobranie suchej masy paszy określano poprzez ważenie dawki pokarmowej przed karmieniem i niedojadów po karmieniu, oznaczając suchą masę co 3 dni podczas trwania eksperymentu.

Tabela 1. Skład chemiczny dawki TMR
Table 1. Chemical content of TMR diet

Wyszczególnienie	
Item	
Sucha masa [%]	46,72
Dry matter	
Popiół surowy [% SM]	5,96
Crude ash [% DM]	
Białko ogólne [% SM]	16,02
Crude protein [% DM]	
Tłuszcz [% SM]	3,20
Crude fat [% DM]	
Włókno surowe [% SM]	18,29
Crude fiber [% DM]	
BAW [% SM] – [% DM]	56,53
NDF [% SM] – [% DM]	38,38
ADF [% SM] – [% DM]	20,37
Wartość pokarmowa	
Nutritive value	
JPM	20,93
BTJN [g]	2936
BTJE [g]	2135
JWK	18,31
P [g]	59
Ca [g]	182

BAW – bezazotowe związki wyciągowe – Nitrogen-free extract, NDF – Włókno rozpuszczalne w detergentach neutralnych – Neutral detergent fiber, ADF – Włókno rozpuszczalne w detergentach kwaśnych – Acid detergent fiber

JPM – Jednostka paszowa produkcji mleka – Feed unit for lactation

JWK – Jednostka wypełnieniowa paszy objętościowej dla krów mlecznych – Fill unit for lactation

Krowy grupy kontrolnej (n=8) żywiono dawką TMR, natomiast grupie doświadczalnej dodawano do dawki TMR niechroniony olej rybny z wątroby dorsza (P.H. Island, Polska) wraz z mikroalgami morskimi (DHA Gold, Novus Polska). Zawartość tłuszczu w mikroalgach według producenta wynosi 35%, natomiast kwasu eikozapentaenowego (EPA) 1,9%, a dokozaheksaenowego (DHA) 42,3%. Zawartość kwasów n-3 w oleju rybnym wynosiła dla EPA 8,22%, natomiast DHA 11,31% (badania własne). Dodatki stosowano od 7. dnia laktacji, przez okres 8 tygodni, w dawce 1% suchej masy (SM) raz dziennie.

Krew do badań biochemicznych pobierano od krów z żyły szyjnej zewnętrznej (*v. jugularis externa*) w godzinach porannych przed karmieniem na początku badań (7. dzień laktacji) oraz po 4 i 8 tygodniach trwania doświadczenia. Analizy parametrów biochemicznych w surowicy krwi wykonano przy użyciu analizatora Pentra 400 (Horiba ABX Diagnostics, Francja), oznaczając:

- stężenie glukozy metodą oksydazową przy użyciu odczynników firmy HORIBA ABX (Glukoza PAP, Nr kat. A11A01679),
- koncentrację kwasu β -hydroksymasłowego (BHB), wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) – metodą enzymatyczną przy użyciu odczynników firmy Randox (RANBUT, Nr kat. RB1007 i WKT Nr kat. FA 115),

- stężenie triglicerydów (TG), cholesterolu całkowitego metodą enzymatyczną, odczynniki HORIBA ABX (TG Nr kat. A11A01640, cholesterol Nr kat. A11A01634),
- aktywność enzymów: aminotransferazy asparaginianowej (AST), dehydrogenazy meczanowej (LDH) i γ -glutamylotransferazy (GGT) metodą kinetyczną według zaleceń IFCC, przy użyciu odczynników firmy HORIBA ABX (ALT Nr kat. A11A01629, GGT Nr kat. A11A01630),
- stężenie bilirubiny całkowitej metodą kolorymetryczną, odczynniki HORIBA ABX (Nr kat. A11A01639).

W tych samych terminach co badania krwi pobierano reprezentatywne próby mleka celem oznaczenia składu chemicznego (tłuszcz, białko, laktoza, sucha masa) analizatorem Bentley 150 (Bentley Instruments, USA) oraz liczby komórek somatycznych przy użyciu analizatora Somacount 150 (Bentley Instruments, USA). Oceniono również kondycję krów metodą BCS (1–5 pkt).

Wszystkie wartości liczbowe uzyskane podczas badań poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu pakietu Statistica ver. 10. Uwzględniono średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe, standardowy błąd średniej (SEM). Wykonano jednokierunkową analizę wariancji przy użyciu procedury ANOVA. Istotność różnic pomiędzy średnimi oszacowano za pomocą testu Duncana.

WYNIKI BADAŃ

Średnie pobranie suchej masy dawki pokarmowej było zbliżone u obu grup (tab. 2). Nieco wyższe pobranie suchej masy dawki w grupie kontrolnej przełożyło się na wyższą wydajność mleka 37,38 kg w porównaniu z 35,65 kg. W okresie badań wyższą kondycją charakteryzowały się krowy grupy doświadczalnej. Zawartość tłuszczu w grupie doświadczalnej była niższa (3,81%), podczas gdy u krów kontrolnych wyniosła 3,98%. Stwierdzono jednocześnie wyższą zawartość białka w mleku krów kontrolnych. Różnic statystycznych pomiędzy grupami, jak i pobraniami w obrębie grupy nie odnotowano w zawartości laktozy, natomiast wystąpiły pomiędzy zawartością suchej masy ($p \leq 0,01$). Średnia liczba komórek somatycznych w okresie badań była podwyższona w grupie kontrolnej, przekraczając wartości dopuszczalne dla mleka surowego [Rozporządzenie (WE) nr 853/2004]. Niższą ($p \leq 0,05$) ich zawartość w mleku odnotowano w grupie doświadczalnej. Występujące podczas badań przypadki podklinicznego stanu zapalnego gruczołu mlekowego wynikały prawdopodobnie z braku higieny doju i wpływu czynników środowiskowych.

Tabela 2. Pobranie suchej masy, BCS, wydajność mleka i jego skład [\pm s]

Table 2. Dry matter intake, BCS, milk yield, milk composition

Wyszczególnienie Item	Grupa – Group	
	Kontrolna	Olej rybny + algi Fish oil + algae
1	2	3
Pobranie suchej masy [kg] Dry matter intake	22,64 \pm 1,23	21,98 \pm 1,48
BCS [pkt]	3,22 \pm 0,37	3,31 \pm 0,24

Tabela 2 cd.
Table 2 cont.

1	2	3
Wydajność mleka [kg/dzień] Milk yield [kg/d]	37,38 ± 3,24	35,65 ± 4,14
Tłuszcz [%] Fat	3,98 ± 0,92	3,81 ± 0,79
Białko [%] Protein	3,32 ± 0,32	3,22 ± 0,21
Laktoza [%] Lactose	4,87 ± 0,32	4,89 ± 0,21
Sucha masa [%] Total solids	12,76 ± 1,10 ^a	12,14 ± 1,17 ^B
LKS × 10 ³ /ml SCC × 10 ³ /ml	433,92 ± 135,39 ^a	256,54 ± 115,72 ^b

a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,05$

a, b – means marked with different letters differ statistically with $p \leq 0,05$

A, B – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,01$

A, B – means marked with different letters differ statistically with $p \leq 0,01$

Analiza parametrów charakteryzujących gospodarkę węglowodanowo-lipidową wykazała, że w surowicy krwi krów żywionych z dodatkiem oleju rybnego i mikroalg morskich, w porównaniu z krowami kontrolnymi, koncentracja glukozy wyraźnie wzrosła po 4 tygodniach stosowania dodatków. Po tym okresie w grupie doświadczalnej zaznaczył się spadek, natomiast w grupie kontrolnej widoczne były tendencje wzrostowe zawartości tego parametru w surowicy krwi. W grupie kontrolnej po 4 tygodniach eksperymentu widoczny był wzrost tego parametru, a następnie obniżenie się, zaś w grupie doświadczalnej systematyczny wzrost (tab. 3). W surowicy krwi krów otrzymujących olej rybny wraz z algami morskimi w ciągu 8 tygodni podawania preparatów wzrosło ($p \leq 0,05$) stężenie cholesterolu (z 3,74 mmol/l do 6,19 mmol/l) oraz triglicerydów (z 0,10 do 0,16 mmol/l). Średnia zawartość WKT w surowicy krwi kształtowała się u obu grup krów na zbliżonym poziomie w poszczególnych pobraniach i nie stwierdzono w okresie trwania doświadczenia różnic statystycznych (tab. 3).

W grupie krów kontrolnych stwierdzono podwyższoną aktywność AST w 5. tygodniu laktacji. Tendencje wzrostowe aktywności tego enzymu również odnotowano w surowicy krwi krów doświadczalnych (tab. 4). Podobnie kształtowała się w okresie badań aktywność GGT. Stosowanie zwiększonej podaży PUFA, wraz z podawanym krowom olejem rybnym i algami, przyczyniło się do istotnego wzrostu aktywności GGT ($p \leq 0,01$). Aktywność tego enzymu mieściła się jednak w granicach wartości prawidłowych podawanych przez Winnicką [2008]. Aktywności LDH mimo pewnych wahań w dniu zakończenia badań nie różniła się pomiędzy grupami. W dniu rozpoczęcia doświadczenia stężenie bilirubiny kształtowało się na wysokim poziomie u krów kontrolnych (9,07 $\mu\text{mol/l}$), by w następnych tygodniach obniżyć się do wartości 5,92 $\mu\text{mol/l}$. W grupie doświadczalnej najwyższy poziom stwierdzono po 4 tygodniach podawania preparatów (8,69 $\mu\text{mol/l}$) i niewielkie obniżenie się w dniu zakończenia badań (7,64 $\mu\text{mol/l}$).

Tabela 3. Zawartość badanych parametrów biochemicznych w surowicy krwi krów [\pm s]
Table 3. Metabolite concentrations in serum of cows

Wyszczególnienie Item	Tygodnie laktacji Weeks of lactation	Grupa – Group	
		Kontrolna Control	Olej rybny + algi Fish oil + algae
Glukoza [mmol/l] Glucose	1	3,17 \pm 0,36	2,92 \pm 0,32
	5	3,09 \pm 0,40	3,53 \pm 0,36
	9	3,21 \pm 0,66	3,00 \pm 0,34
WKT [mmol/l] NEFA	1	0,40 \pm 0,27	0,19 \pm 0,07
	5	0,31 \pm 0,21	0,25 \pm 0,04
	9	0,21 \pm 0,10	0,23 \pm 0,05
BHB [mmol/l] BHBA	1	0,71 \pm 0,18	0,83 \pm 0,47
	5	1,26 \pm 0,90	0,95 \pm 0,37
	9	0,67 \pm 0,27	1,08 \pm 0,37
Cholesterol [mmol/l] Cholesterol	1	4,87 \pm 0,84a	3,74 \pm 0,66b
	5	3,68 \pm 1,24a	4,21 \pm 0,72b
	9	3,68 \pm 0,86A	6,19 \pm 0,81B
Triglicerydy [mmol/l] Triacylglycerols	1	0,12 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02
	5	0,10 \pm 0,03A	0,16 \pm 0,03B
	9	0,09 \pm 0,3A	0,16 \pm 0,04B

a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,05$

a, b – means marked with different letters differ statistically with $p \leq 0.05$

A, B – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,01$

A, B – means marked with different letters differ statistically with $p \leq 0.01$

Tabela 4. Aktywność enzymów oraz stężenie bilirubiny całkowitej w surowicy krwi krów [\pm s]
Table 4. Enzymes activity and total bilirubin content in blood serum of cows

Wyszczególnienie Item	Tygodnie laktacji Weeks of lactation	Grupa – Group	
		Kontrolna Control	Olej rybny+algi Fish oil+algae
AST [U/l]	1	74,43 \pm 10,36	65,59 \pm 6,73
	5	98,59 \pm 26,44	73,09 \pm 6,88
	9	80,23 \pm 21,01	82,58 \pm 12,94
GGT [U/L]	1	24,63 \pm 2,59 ^A	30,70 \pm 4,83 ^B
	5	26,50 \pm 7,50 ^A	33,08 \pm 8,49 ^B
	9	18,40 \pm 4,72 ^A	34,84 \pm 8,97 ^B
LDH [U/l]	1	1602,10 \pm 278,74	1815,77 \pm 395,77
	5	2143,88 \pm 480,77	1756,75 \pm 288,12
	9	1946,0 \pm 470,72	1902,08 \pm 278,74
Bilirubina [μ mol/l] Bilirubine	1	9,07 \pm 3,30	6,48 \pm 3,46
	5	5,31 \pm 2,09	8,69 \pm 3,95
	9	5,92 \pm 2,44	7,64 \pm 4,07

A, B – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $p \leq 0,01$

A, B – means marked with different letters differ statistically with $p \leq 0.01$

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Olej rybny, jak również algi morskie, jest bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [Kupczyński i in. 2011]. Długoterminowe stosowanie tych dodatków w badaniach własnych przyczyniło się do niższego pobrania suchej masy dawki pokarmowych, a tym samym nieco niższej wydajności mleka. Obniżenie pobrania suchej masy paszy również odnotowano w innych badaniach po zastosowaniu niechronionego oleju rybnego [Donovan i in. 2000, Shingfield i in. 2006]. Odmienne wyniki uzyskano, stosując sole wapniowe oleju rybnego (2,3%), gdyż zaobserwowano wzrost wydajności mleka i pobrania paszy bez wpływu jednak na bilans energii [Heravi Moussavi i in. 2007]. Brak wpływu na wydajność i skład mleka stwierdzono, podając krowom różne dawki oleju rybnego i alg morskich [Abu-Ghazaleh i in. 2009]. W cytowanych badaniach wyższą wydajność mleka odnotowano po zastosowaniu alg morskich, natomiast alg w połączeniu z olejem rybnym przyczyniły się do nieco niższej wydajności w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne zależności stwierdzono w badaniach własnych, odnotowując redukcję zawartości tłuszczu w mleku krów, którym podawano olej rybny wraz z algami morskimi. Jest to skutek niepełnego uwodornienia kwasów tłuszczowych, w tym powstawania produktów pośrednich takich jak *trans*-10, *cis*-12 CLA, który jest inhibitorem syntezy tłuszczu w gruczole mlekowym w warunkach stosowania diety bogatej w wielonienasycone kwasy tłuszczowe [Bauman i in. 2008].

W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że DHA jest silnym inhibitorem biowodowania kwasu linolowego [Wallace i in. 2007]. Stosowanie niechronionego oleju rybnego, z dużym udziałem DHA w żywieniu krów, wiąże się ze spadkiem zawartości tłuszczu w mleku [Shingfield i in. 2003, Whitlock i in. 2006]. Boeckeaert i in. [2008] podając krowom algi morskie, stwierdzili spadek koncentracji tłuszczu w mleku z 47,9 do 22,5 g/kg mleka pomiędzy 12. a 19. dniem eksperymentu. Stosowanie alg w formie chronionej lub niechronionej w identycznym stopniu powodowało spadek zawartości tłuszczu w mleku [Franklin i in. 1999]. W badaniach tych nie odnotowano wpływu na zawartość białka w mleku, podobnie jak w badaniach własnych.

Dodatek tłuszczu do dawki pokarmowej krów powoduje zwiększenie w niej koncentracji energii, mogąc mieć jednocześnie wyraźny wpływ na przemiany energetyczne i kształtowanie się szeregu parametrów biochemicznych krwi krów. Tłuszcze roślinne zawierające kwas palmitynowy powodują wzrost koncentracji WKT w surowicy krwi krów [Moallem i in. 2007]. Stosując duże ilości soli wapniowych oleju rybnego, nie odnotowano natomiast ich wpływu na kształtowanie się zawartości WKT we krwi [Heravi Moussavi i in. 2007]. Odmienne wyniki uzyskali Childs i in. [2008], którzy przy wzrastających dawkach oleju rybnego stwierdzili obniżenie stężenia WKT we krwi. W badaniach własnych poza zastosowaniu oleju rybnego i alg nie zauważono nasilonej lipolizy. DeFra-
in i in. [2005] stosując w okresie przejściowym propioniany i długołańcuchowe kwasy tłuszczowe stwierdzili, że wyższe dawki preparatów poprawiły bilans energii po porodzie poprzez obniżenie zawartości WKT we krwi.

Zastosowanie oleju rybnego wraz z olejem roślinnym powodował wzrost stężenia kwasu masłowego w płynie żwaczowym [Palmquist i Griinari 2006], a także produkcji propionianów, podstawowego substratu w procesie glukoneogenezy wątrobowej [Fievez i in. 2003]. W przeprowadzonych badaniach alg wraz z olejem rybnym przyczyniły się do wzrostu stężenia glukozy jedynie po 4 tygodniach doświadczenia. Również Heravi

Moussavi i in. [2007] stosując sole wapniowe oleju rybnego, stwierdzili istotny wzrost ($p \leq 0,05$) stężenia glukozy we krwi. Używając oleju rybnego, nie stwierdzono jego wpływu na koncentrację kwasu β -hydroksymasłowego we krwi [Heravi Moussavi i in. 2007, Childs i in. 2008]. W badaniach własnych nie odnotowano wyraźnego związku podawanych dodatków ze zmianami zawartości kwasu β -hydroksymasłowego w surowicy krwi krów.

Zastosowanie w żywieniu krów oleju rybnego ma pozytywny wpływ na syntezę cholesterolu, prowadząc do jego wzrostu we krwi [Childs i in. 2008]. W badaniach własnych odnotowano liniowy wzrost stężenia cholesterolu po zastosowaniu suplementacji dodatków bogatych w PUFA n-3.

Zwiększona podaż PUFA, wraz z podawanym krowom olejem rybnym i algami, przyczyniła się do istotnego wzrostu ($p \leq 0,01$) aktywności GGT. Zauważono również pewien wzrost aktywności AST, jednak zaobserwowane wartości nie przekraczały norm fizjologicznych [Winnicka 2008]. Mimo wzrostu aktywności swoistego enzymu wątrobowego jakim jest GGT, raczej nie można mówić o uszkodzeniu struktur wątroby krów, gdyż nie było jednocześnie ponadnormatywnego wzrostu aktywności innych enzymów. W badaniach Heravi Moussavi i in. [2007], mimo niższej aktywności AST we krwi krów otrzymujących chroniony olej rybny, także nie stwierdzono różnic statystycznych.

Marczuk i Filar [2003] wskazują na szczególną przydatność oznaczania aktywności GLDH, GGT, AST oraz stężenia bilirubiny w rozpoznawaniu subklinicznych uszkodzeń i zaburzeń czynności wątroby w przebiegu stłuszczenia wątroby. Zakres wartości prawidłowych stężenia bilirubiny całkowitej we krwi obejmuje przedział od 1,9 do 7,0 $\mu\text{mol/l}$ [Winnicka 2008]. W dniu rozpoczęcia badań w grupie kontrolnej krów stwierdzono podwyższone stężenia bilirubiny. Zastosowane dodatki wiązały się z umiarkowanym, przejściowym wzrostem tego parametru. U krów z podkliniczną ketozą stwierdzono wartość tego wskaźnika na poziomie 7,27 $\mu\text{mol/l}$ [Nowakowski 2008], a u krów z podkliniczną postacią zespołu stłuszczenia wątroby w 1.–2. tygodniu laktacji 14,2 $\mu\text{mol/l}$ [Marczuk i Filar 2003]. W badaniach własnych najwyższe stężenie bilirubiny występowało na początku badań w grupie kontrolnej (9,07 $\mu\text{mol/l}$) oraz w 5. tygodniu laktacji u grupy doświadczalnej (8,69 $\mu\text{mol/l}$). Mordak i Nicpoń [2006] oceniając profil metaboliczny pomiędzy 3 a 5 dniem po porodzie u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej, stwierdzili podwyższonego poziom bilirubiny całkowitej (12,34 $\mu\text{mol/l}$).

PODSUMOWANIE

Zwiększona podaż PUFA (olej rybny wraz z algami) w dawce pokarmowej krów prowadziła do mniejszego pobrania paszy i obniżenia wydajności mleka. Zastosowane dodatki spowodowały również redukcję zawartości tłuszczu i białka w mleku. Kształtowanie się parametrów biochemicznych krwi krów doświadczalnych, żywionych paszą z dodatkiem oleju rybnego i alg morskich, świadczy o wpływie tych dodatków na przemiany lipidowe. Stwierdzono wzrost triglicerydów, cholesterolu oraz kwasu β -hydroksymasłowego we krwi. Po zastosowaniu dodatków zaobserwowano wzrost stężenia bilirubiny całkowitej, jednak aktywność enzymów nie wskazywała na zaburzenie funkcjonalne wątroby.

PIŚMIENNICTWO

- Abu-Ghazaleh A.A., Potu R.B., Ibrahim S., 2009. The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *J. Dairy Sci.* 92, 6156–6159.
- Abu-Ghazaleh A.A., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Kalscheur K.F., 2003. Milk conjugated linoleic acid response to fish supplementation of diets differing in fatty acid profiles. *J. Dairy Sci.* 86, 944–953.
- Abu-Ghazaleh A.A., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Whitlock L.A., 2002. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J. Dairy Sci.* 85, 624–631.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. AOAC International, Arlington, VA.
- Bauman D.E., Corl B.A., Peterson D.G., 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants, 146–173. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2. Sebedio J.L., Christie W.W., Adlof R. AOACS Press, Champaign, IL.
- Bauman D.E., Perfield II J.W., Harvatine K.J., Baumgard L.H., 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *J. Nutr.*, 138, 403–409.
- Boeckaert C., Fievez V., Van Hecke D., Verstraete W., Boon N., 2007. Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 767–777.
- Boeckaert C., Vlaeminck B., Dijkstra J., Issa-Zacharia A., van Nespen T., van Straalen W., Fievez V., 2008. Effect of dietary starch or micro alga supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4714–4727.
- Carriquiry M., Weber W.J., Sanders S.R., Baumgard L.H., Crooker B.A., 2008. *In vitro* biohydrogenation of protected dietary fats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 339–355.
- Castañeda-Gutiérrez E., Pelton S.H., Gilbert R.O., Butler W.R., 2009. Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables. *Anim. Reprod. Sci.* 112, 301–315.
- Childs S., Hennessy A.A., Sreenan J.M., Wathes D.C., Cheng Z., Stanton C., Diskin M.G., Kenny D.A., 2008. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenol.* 70, 595–611.
- DeFrain J.M., Hippen A.R., Kalscheur K.F., Patton R.S., 2005. Effects of feeding propionate and calcium salts of long-chain fatty acids on transition dairy cow performance. *J. Dairy Sci.* 88, 983–993.
- Dhiman T.R., Satter L.D., Pariza M.W., Galli M.P., Albright K., Tolosa M.X., 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83, 1016–1027.
- Donovan C.D., Schingoethe D.J., Baer R.J., Ryali J., Hippen A.R., Franklin S.T., 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 2620–2628.
- Elizalde J.C., Aldrich C.G., LaCount D.W., Druckley J.K., Marchen N.R., 1999. Ruminant and total tract digestibility in steers fed diets containing liquefied or prilled saturated fatty acids. *J. Anim. Sci.* 77, 1930–1939.
- Fievez V., Dohme F., Danneels M., Raes K., Demeyer D., 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104, 41–58.

- Franklin S.T., Martin K.R., Baer R.J., Schingoethe D.J., Hippen A.R., 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* 129, 2048–2054.
- Heravi Moussavi A.R., Gilbert R.O., Overton T.R., Bauman D.E., Butler W.R., 2007. Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on milk yield and metabolic responses in early lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 136–144.
- Kupczyński R., Janeczek W., Kinal S., Kuczaj M., 2011. Wykorzystanie kwasów tłuszczowych w modyfikacji profilu kwasów tłuszczowych mleka krów. *Medycyna Wet.* 67, 304–308.
- Marczuk J., Filar J., 2003. Ocena uszkodzenia wątroby i jej zaburzeń czynnościowych w przebiegu zespołu nadmiernej mobilizacji tłuszczu u krów mlecznych. *Medycyna Wet.* 59, 47–50.
- Moallem U., Katz M., Arieli A., Lehrer H., 2007. Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 3846–3856.
- Mordak R., Nicpoń J., 2006. Hematologiczne i metaboliczne parametry krwi u krów w czasie okołoporodowym i wzrastającej laktacji. *Medycyna Wet.* 62, 1292–1294.
- Nowak W., Potkański A., 2000. The effect of rolled rapeseed on milk composition and lactational responses. *J. Anim. Feed. Sci.* 9, 425–434.
- Nowakowski H., 2008. Wyniki wybranych parametrów biochemicznych w aspekcie stanu czynnościowego wątroby w przebiegu pierwotnej ketozy u krów. *Medycyna Wet.* 64, 197–201.
- Or-Rashid M.M., Kramer J.K.G., Wood M.A., McBride B.W., 2008. Supplemental algal meal alters the ruminal trans-18:1 fatty acid and conjugated linoleic acid composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 86, 187–196.
- Palmquist D.L., Griinari J.M., 2006. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 358–369.
- Petit H.V., Germiquet C., Lebel D., 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3889–3898.
- Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 roku ustanawiającego szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. L 137 z 30.4.2004)
- Shingfield K., Ahvenjärvi S., Toivonen V., Ärölä A., Nurmela K.V.V., Huhtanen P., Griinari J., 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77, 165–179.
- Shingfield K.J., Reynolds C.K., Hervas G., Griinari J.M., Grandison A.S., Beever D.E., 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 714–732.
- Strzetelski J. (red.), 2009. IZ PIB-INRA. Normy żywienia przeżuwaczy. Wartość pokarmowa francuskich i krajowych pasz dla przeżuwaczy. Wyd. IZ PIB Kraków.
- Wallace R.J., McKain N., Shingfield K.J., Devillard E., 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J. Lipid Res.* 48, 2247–2254.
- Whitlock L.A., Schingoethe D.L., AbuGhazaleh A.A., Hippen A.R., Kalscheur K.F., 2006. Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans. *J. Dairy Sci.* 89, 3972–3980.
- Winnicka A., 2008. Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wyd. SGGW. Warszawa.

INFLUENCE OF MARINE ALGAE AND FISH OIL APPLICATION ON DAIRY COWS METABOLISM

Abstract. The study presented concerned an influence of an application of fish oil from cod liver with marine microalgae in feed doses of dairy cows in the first period of lactation on selected biochemical parameters of blood and milk yield. The fish oil with microalgae was applied to cows from 7th day of lactation for a period of 8 weeks, in an amount of 1% of feed dose dry matter. The additives used caused decrease in feed intake, what in turn resulted in lowered milk yield. Also a reduction of fat and protein content in milk was observed. Increased PUFA content in feed dose caused an increase in triglycerides, cholesterol and β -hydroxybutyrate acid content in blood serum. An increase in total bilirubin concentration was also noted, however enzymes activity did not point any functional liver disorders.

Key words: cows, fish oil, marine micro alga, blood metabolic profile

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Kupczyński R., Janeczek W., Pogoda-Sewerniak K., Dziecioł M., Szoltyś M., Zawadzki W., 2011. Wpływ zastosowania alg morskich i oleju rybnego na wydajność, skład mleka oraz parametry biochemiczne krwi krów. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 10 (4), 35–46.

RECENZENCI – REVIEWERS

prof. dr hab. Maciej Ugorski
Wrocław University of Environmental and Life Sciences

prof. dr hab. Andrzej Depta
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

prof. dr hab. Wiesław Skrzypczak
West Pomeranian University of Technology Szczecin

prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

prof. dr hab. Piotr Tryjanowski
University of Life Sciences in Poznań

prof. dr hab. Iwona Puzio
University of Life Sciences in Lublin

prof. dr hab. Jolanta Chichłowska
University of Life Sciences in Poznań

prof. dr hab. Wojciech Zawadzki
Wrocław University of Environmental and Life Sciences

prof. dr hab. Danuta Strusińska
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

prof. dr hab. Ryszard Bobowiec
University of Life Sciences in Lublin

prof. dr hab. Zbigniew Boratyński
University of Life Sciences in Lublin

prof. dr hab. Izabela Krakowska
University of Life Sciences in Lublin

prof. dr hab. Jan Szarek
Agricultural University of Cracow

prof. dr hab. Hanna Bis-Wenzel
University of Life Sciences in Lublin

prof. dr hab. Anna Wójcik
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

prof. dr hab. Szymon Godynicki
University of Life Sciences in Poznań

SPIS TREŚCI

Albert Czerski, Jolanta Bujok, Agnieszka Rusiecka, Wojciech Zawadzki, Jan Gnus, Willy Hauser, Kornel Ratajczak, Wojciech Witkiewicz Eksperymentalne metody wywoływania tętniaków aorty brzusznej ze szczególnym uwzględnieniem świni jako dużego modelu zwierzęcego	5
Dorota Graboś, Anna Gawłowska Wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 na metabolizm tkanki kostnej.....	23
Robert Kupczyński, Witold Janeczek, Krystyna Pogoda-Sewerniak, Michał Dzięcioł, Marek Szoltysik, Wojciech Zawadzki Wpływ zastosowania alg morskich i oleju rybnego na wydajność, skład mleka oraz parametry biochemiczne krwi krów	35
Recenzenci – Reviewers	47