

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina TREBUŠAK

**PREBAVLJIVOST HRANLJIVIH SNOVI PRI
LINIJAH MIŠI SELEKCIONIRANIH NA VIŠJI
OZIROMA NIŽJI ODSOTOK MAŠČEVJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina TREBUŠAK

**PREBAVLJIVOST HRANLJIVIH SNOVI PRI LINIJAH MIŠI
SELEKCIONIRANIH NA VIŠJI OZIROMA NIŽJI ODSOTOK
MAŠČEVJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DIGESTIBILITY OF NUTRIENTS IN MOUSE STRAINS SELECTED
FOR HIGH AND LOW BODY FAT CONTENT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za prehrano in v Centru za rejo in poskuse z laboratorijskimi mišmi na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Simona Horvata in za somentorico doc. dr. Tatjano Pirman.

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tatjana PIRMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 12.09.2008

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tina Trebušak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG	prehrana živali/hranljive snovi/prebavljivost/linije/selekcija/maščevje/laboratorijske miši
KK	AGRIS L51/L10
AV	TREBUŠAK, Tina
SA	HORVAT, Simon (mentor)/PIRMAN, Tatjana (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2008
IN	PREBAVLJIVOST HRANLJIVIH SNOVI PRI LINIJAH MIŠI SELEKCIONIRANIH NA VIŠJI OZIROMA NIŽJI ODSOTOK MAŠČEVJA
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	VIII, 37 str., 15 pregl., 3 sl., 24 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Debelost v današnjem času predstavlja velik zdravstveni problem pri ljudeh, prav tako pa je prekomerna zamaščenost nezaželen pri vzreji domačih živali. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, če se dve liniji miši selekcionirani na višji (linija F) oziroma nižji (linija L) odstotek maščevja razlikujeta v prebavljivost hranljivih snovi. Liniji sta bili razviti na Univerzi v Edinburghu z dvosmerno selekcijo (53 generacij) na odstotek telesnega maščevja. V preliminarnih poskusih smo živali testirali v metabolnih kletkah in poskušali optimizirati razne parametre za izvedbo bilančnega poskusa. Ugotovili smo, da sta naši liniji zelo občutljivi na pogoje v metabolnih kletkah, saj so vse živali shujšale v veliki meri in tako ne bi bilo mogoče objektivno interpretirati rezultate bilančnega poskusa. Zato smo dva prebavljivostna poskusa izvedli v navadnih kletkah in se odpovedali zbiranju seča in s tem meritvi bilance. V prvem smo uporabili 11 samcev linije F in 10 samcev linije L neizenačenih starosti (med 9,0 in 18,6 tednov), v drugem pa 11 samcev linije F in 12 samcev linije L z manjšimi razlikami v starosti (med 9,6 in 11,0 tednov). V obdobju petih dni smo živali dnevno tehtali, beležili količino zaužite krme in zbirali blato. Z weendsko analizo smo opravili analize krme in blata in ugotovili, da med linijama F in L obstajajo statistično značilne razlike v prebavljivosti surovih beljakovin in surovih maščob, ni pa statistično značilnih razlik v količini zaužite krme. Tako surove beljakovine kot tudi surove maščobe je bolje prebavila linija L, 79,6 % oziroma 91,8 %, medtem ko je linija F surove beljakovine prebavila v povprečju 77,1 % in surove maščobe 87,0 %. Rezultati so pokazali, da z razlikami v prebavljivosti ne moremo razložiti vseh fenotipskih razlik med linijama. Glede na dejstvo, da smo ugotovili boljšo prebavljivost pri suhi liniji ter enako zauživanje krme kot pri debeli liniji, obstajajo verjetno na področju porabe energije med linijama še večje razlike, kot smo predhodno domnevali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.084/.087(043.2)=163.6
CX animal nutrition/nutrients/digestibility/lines/selection/body fat/laboratory mice
CC AGRIS L51/L10
AU TREBUŠAK, Tina
AA HORVAT, Simon (supervisor)/PIRMAN, Tatjana (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2008
TI DIGESTIBILITY OF NUTRIENTS IN MOUSE STRAINS SELECTED FOR HIGH AND LOW BODY FAT CONTENT
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 37 p., 15 tab., 3 fig., 24 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Obesity presents a growing health problem and is also an unwanted component of growth in domestic animals. The purpose of this study was to analyse the digestibility of nutrients in a polygenic mouse model that has been previously developed at the University of Edinburgh by divergent selection for 53 generations, resulting in lines that significantly differ in body fat content. Preliminary tests in metabolic cages were performed to optimize various parameters for the prospective energy balance experiment. The results revealed extreme sensitivity of our strains to metabolic cage conditions as all the test animals kept losing body weight to a significant degree during the preliminary test period. For this reason, two separate digestibility experiments in standard mouse cages were performed without collecting urine, because the results, acquired in the metabolic cages could not be interpreted objectively. The first experiment included 11 F and 10 L males of various ages (between 9.0 and 18.6 weeks). The second experiment was performed on 11 F and 12 L males at around the same age (between 9.6 and 11.0 weeks). Mice and consumed food weights were recorded daily for 5 days and faeces were also collected. The Wend analysis of food and faeces showed statistically significant differences in the digestibility coefficients of crude protein and crude fat between the F and L strain, but not in the food intake. The crude protein and the crude fat were digested more efficiently by the L strain 79.6% and 91.8%, while the F strain digested 77.1% of crude protein and 87.0% of crude fat. The results of our study revealed, that the differences in digestibility of nutrients could not explain the phenotypic differences between the F and L strain. Due to the improved digestibility in the L strain, and at the same time equal food intake in both strains, we could conclude that even greater differences might exist in energy consumption between the F and L strain, than predicted previously.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 HRANLJIVE SNOVI	2
2.1.1 Beljakovine	3
2.1.2 Maščobe	4
2.2 PREBAVLJIVOST	5
2.2.1 Navidezna in prava prebavljivost	5
2.2.2 Vplivi na prebavljivost	6
2.2.3 Prebavljivost pri laboratorijskih miših	7
2.3 PREGLED OBJAV O LINIJAH FLI IN FHI	9
2.3.1 Fizična aktivnost pri linijah FLI in FHI	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	13
3.2 OSKRBA MIŠI	13
3.2.1 Krma in voda	13
3.2.2 Temperatura in vlaga zraka, svetloba	14
3.2.3 Oprema	14
3.2.4 Čiščenje	14

3.3	PRELIMINARNA POSKUSA	15
3.4	PREBAVLJIVOSTNA POSKUSA	16
3.4.1	Poskus 1	16
3.4.2	Poskus 2	16
3.4.3	Delo v mišji koloniji – zbiranje blata	17
3.4.4	Delo v laboratoriju – analiza blata	17
3.5	OBDELAVA PODATKOV	19
4	REZULTATI	21
4.1	PRELIMINARNA POSKUSA	21
4.2	PREBAVLJIVOSTNA POSKUSA	25
4.2.1	Poskus 1	25
4.2.2	Poskus 2	27
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	29
5.1	RAZPRAVA	29
5.1.1	Preliminarna poskusa	29
5.1.2	Prebavljivostna poskusa	31
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	35
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Živali v preliminarnem poskusu	15
Preglednica 2: Živali v poskusu 1 razvrščene po starosti ob začetku poskusa	16
Preglednica 3: Živali v poskusu 2 razvrščene po starosti ob začetku poskusa	17
Preglednica 4: Kemijska sestava krmne mešanice	21
Preglednica 5: Telesna masa živali in zaužita krma v preliminarnem poskusu	21
Preglednica 6: Prebavljivost dušika v preliminarnem poskusu	22
Preglednica 7: Prebavljivost beljakovin v preliminarnem poskusu	23
Preglednica 8: Prebavljivost maščob v preliminarnem poskusu	23
Preglednica 9: Sprememba telesne mase posameznih živali v preliminarnem poskusu	24
Preglednica 10: Telesna masa živali in zaužita krma v poskusu 1	26
Preglednica 11: Prebavljivost dušika v poskusu 1	26
Preglednica 12: Prebavljivost maščob v poskusu 1	27
Preglednica 13: Telesna masa živali in zaužita krma v poskusu 2	27
Preglednica 14: Prebavljivost dušika v poskusu 2	28
Preglednica 15: Prebavljivost maščob v poskusu 2	28

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sestava rastlinskega in živalskega organizma	2
Slika 2: Primerjava odstotkov telesne maščobe skozi 53 generacij dvosmerne selekcije	11
Slika 3: Sprememba telesne mase posameznih živali v preliminarnem poskusu	25

1 UVOD

Debelost in naraščanje indeksa telesne mase (Taylor in Phillips, 1997) v današnjem času predstavlja velik zdravstveni problem in s sekundarnimi obolenji ogroža ljudi razvitega sveta (Echwald, 1999) in vse bolj tudi ljudi iz držav v razvoju (Bell in sod., 2005). Bolezni, kot so sladkorna bolezen tipa 2, ateroskleroza, povišan krvni tlak, bolezni srca in podobno, so lahko posledica debelosti, prav tako pa se povečuje možnost pojava različnih oblik raka (Echwald, 1999; Rocha in sod., 2003).

Debelost oziroma prekomerna zamaščenost predstavlja problem tudi pri domačih živalih namenjenih za prehrano ljudi. Spremembe v prehrani ljudi zahtevajo vzrejo živali z manj telesne maščobe. Poleg tega imajo praviloma bolj zamaščene živali tudi slabšo konverzijo krme (porabijo več krme na enoto prirasta), kar ima za posledico slabšo ekonomičnost priraje. Na zamaščenost oziroma na nalaganje maščevja poleg genov vpliva tudi okolje, v prvi vrsti prehrana in fizična aktivnost. Vprašanje, ki se ob tem postavlja je, ali lahko del variabilnosti med osebki z različno stopnjo zamaščenosti razložimo z razlikami v prebavljivosti hranljivih snovi med temi osebki.

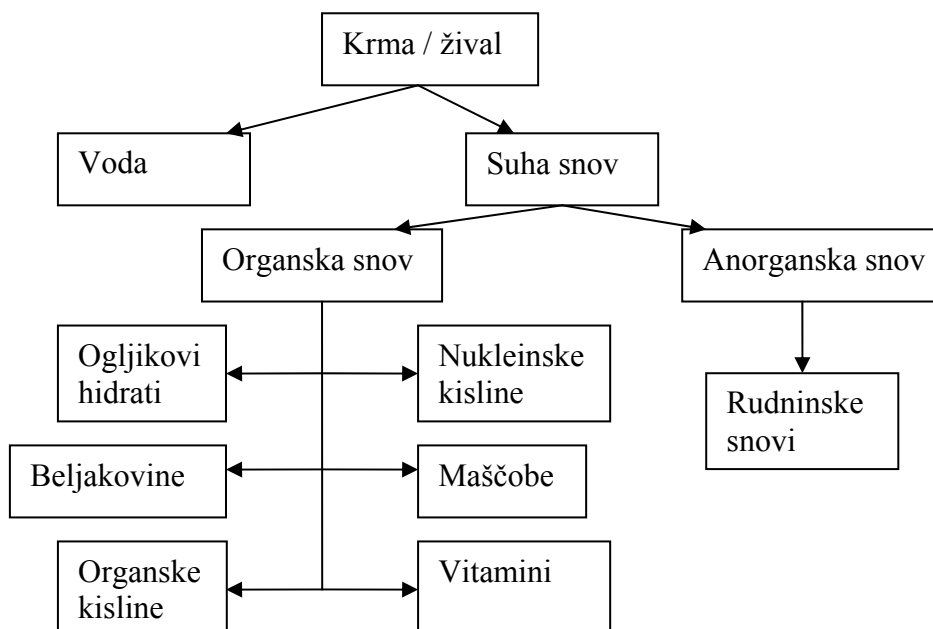
Na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko redijo dve inbridirani liniji laboratorijskih miši selekcionirani na višji oziroma nižji odstotek maščevja. Med obema linijama miši ni statistično značilnih razlik v zauživanju krme, obstajajo pa velike razlike v fenotipu (Morton in sod., 2005). Miši z višjim odstotkom maščevja imajo 22 % telesnih maščob, medtem ko imajo tiste z nižjim odstotkom le 4 % telesnih maščob (Bünger in Hill, 1999).

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšna je prebavljivost surovih maščob in surovih beljakovin pri dveh linijah miši, selekcioniranih na višji oziroma nižji odstotek maščevja. Postavili smo ničelno hipotezo, da med linijama ni razlik v prebavljivosti hranljivih snovi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HRANLJIVE SNOVI

Vsako živo bitje za življenje, preživetje, proizvodnjo in razmnoževanje potrebuje hrano oziroma krmo. Krmo sestavljajo različne hranljive snovi z določenimi kemičnimi in fizikalnimi lastnostmi. Tako kot v krmi, so hranljive snovi tudi v živalskem in rastlinskem organizmu, razlikujejo pa se po kemični sestavi in količinah (Orešnik in Kermauner, 2008).



Slika 1: Sestava rastlinskega in živalskega organizma (povzeto in prirejeno po Orešnik in Kermauner, 2008)

Kot vidimo na sliki 1 sta krma ali rastlinski oziroma živalski organizem sestavljena iz vode in suhe snovi. Hranljive snovi v suhi snovi delimo v skupine po njihovih lastnostih in funkcijah. V grobem jih razdelimo na anorganske in organske snovi. Organske snovi sestavljajo ogljikovi hidrati, maščobe, beljakovine, nukleinske kisline, organske kisline in vitamini, anorganske pa rudninske snovi (Orešnik in Kermauner, 2008).

2.1.1 Beljakovine

Surove beljakovine, ki jih določimo v postopku Weendske analize, sestavljajo prave beljakovine in nebeljakovinske dušične spojine (proste aminokisljine, nukleinske kisline, amidi, nitrati, alkaloidi, amini in podobno). Da določimo količino pravih beljakovin, v pripravljeno raztopino vzorca dodamo bakrov hidroksid, pri čemer se beljakovine koagulirajo (Orešnik in Kermauner, 2008).

Prave beljakovine oziroma proteini so organske snovi sestavljene iz aminokisljin in imajo visoko molekularno maso. V molekuli beljakovine so aminokisljine povezane v polipeptidno verigo v točno določenem zaporedju, tako imenovana aminokisljinska sekvenca ali sosledje aminokisljin. Dolžina polipeptidne verige in aminokisljinska sekvenca odločata o funkcijah beljakovin (Orešnik in Kermauner, 2008).

Beljakovine so kot del celične stene in protoplazme prisotne v vseh celicah živalskega in rastlinskega organizma. Njihova značilnost je v tem, da ima vsaka vrsta beljakovin veliko specifičnost v svoji kemični zgradbi, kar jim omogoča opravljanje različnih funkcij v različnih organizmih (Orešnik in Kermauner, 2008).

Prave beljakovine delimo v dve skupini in sicer na enostavne (proteini) in sestavljene (konjugirane) beljakovine (proteidi). Enostavne beljakovine sestavljajo le aminokisljine in jih glede na obliko razdelimo na skleroproteine (beljakovine v trakovih) in sferoproteine (globularni proteini). Skleroproteini imajo strukturno vlogo, večinoma so prisotni v podpornih oziroma zaščitnih tkivih. V to skupino sodijo kolageni, elastin in keratini. V skupino sferoproteinov sodijo vsi encimi, antigeni, tisti hormoni, ki so beljakovine, albumini, histoni, protamini, globulini. Sestavljene beljakovine ali proteidi so sestavljeni iz beljakovinskega in nebeljakovinskega dela (prostetična skupina). Sestavljene beljakovine glede na nebeljakovinski del delimo na lipoproteide (prostetična skupina so maščobe), glikoproteide (prostetična skupina so ogljikovi hidrati), nukleoproteide (povezani z nukleinskimi kislinami), fosfoproteide (fosforna kislina kot prostetična skupina) in kromoproteide (beljakovine povezane s specifično rudninsko snovjo) (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Biološki pomen beljakovin

Beljakovine imajo v organizmu mnogostranske naloge, saj so sestavni del ogrodja telesnih celic, opravljajo zaščitne funkcije (koža, lasje, volna, perje), imajo kontraktilno vlogo in so učinkovine (encimi). Beljakovine tudi regulirajo procese presnove in reprodukcije (hormoni), prenašajo rudninske snovi in kisik po krvnem obtoku, omogočajo prenos metabolitov v celice. So sestavni del protiteles in sodelujejo v obrambnem sistemu, odvečne aminokisliline pa se izkoristijo kot vir energije (Orešnik in Kermauner, 2008).

2.1.2 Maščobe

Surove maščobe v postopku weendske analize določamo z ekstrakcijo s petroletrom. V skupino surovih maščob s to določitvijo poleg pravih maščob zajamemo tudi druge v petroletru topne snovi, ki jih imenujemo lipoidne (Orešnik in Kermauner, 2008).

Prave maščobe so gliceridi maščobnih kislin in imajo hidroksilne skupine glicerola navadno zaestrene s tremi različnimi maščobnimi kislinami. To so trigliceridi ali triacilgliceroli. O monogliceridu govorimo, ko je v molekuli prisotna le ena maščobna kislina, o digliceridu pa ob prisotnosti dveh maščobnih kislin. Maščobne kisline so ogljikovodikove verige brez, z eno ali več dvojnimi vezmi med ogljikovimi (C) atomi in s karboksilno skupino (-COOH) na koncu. Nenasičene maščobne kisline so tiste z enojnimi vezmi med C atomi, nasičene pa imajo eno ali več dvojnih vezi v verigi. Glede na število ogljikovih atomov delimo maščobne kisline v tri skupine: kratkoverižne (2-8 ogljikovih atomov), srednjeverižne (10-16 ogljikovih atomov) in dolgoverižne maščobne kisline (18-36 ogljikovih atomov). Maščobnokislinska sestava je tudi razlog za razlike v lastnostih in funkcijah maščob v prebavi in presnovi (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Biološki pomen maščob

Maščobe se v organizmu neposredno izkoriščajo kot vir energije in vsebujejo 2,0-2,5-krat večjo koncentracijo energije kot beljakovine ali ogljikovi hidrati. Zato jih uporabljamo predvsem takrat, ko potrebujemo zelo koncentriran, energijsko bogat obrok. Maščobe so v organizmu tudi rezervne snovi (energetske rezervne snovi). Presežne količine organskih

snovi se pretvorijo v telesne maščobe. Te maščobe se nalagajo v maščobnem in tudi mišičnem tkivu kot rezervne maščobe, ki se mobilizirajo in uporabijo kot vir energije pri pomanjkanju le-te v obroku. Rezervna maščoba tudi ščiti organizem pred toplotnimi spremembami v okolju, služi kot izolacijska plast. Maščobe so tudi sestavni del celičnih membran, imajo strukturno vlogo. Poleg vsega pa izboljšujejo absorpcijo vitaminov, ki so topni v maščobah (Orešnik in Kermauner, 2008).

2.2 PREBAVLJIVOST

Krma in hranljive snovi v njej so v prebavilih podvržene procesom prebave. Del hranljivih snovi se prebavi, razgradi do enostavnih molekul in nato absorbira. Tiste hranljive snovi, ki se ne prebavijo in ne absorbirajo, se izločijo z blatom. Razlika, med zaužitimi hranljivimi snovmi in tistimi ki so se izločile v blatu, predstavlja količino prebavljenih hranljivih snovi. S prebavljivostjo lahko ocenimo kakovost oziroma parametre hranilne vrednosti nekega krmila. Samo s kemično analizo krmila ne moremo oceniti njegove hranilne vrednosti, saj je ta odvisna predvsem od prebavljivosti snovi (Orešnik in Kermauner, 2008).

2.2.1 Navidezna in prava prebavljivost

Poznamo navidezno in pravo prebavljivost. Navidezna prebavljivost prikazuje razliko med zaužitimi in z blatom izločenimi hranljivimi snovmi. Ker pa so v blatu tudi druge snovi, ki niso neposredno povezane s hranljivimi snovmi krme (presnovni produkti, odmrle črevesne celice, levkociti, eritrociti,...) tako imenovane endogene snovi blata, le te odštejemo od ugotovljenih količin snovi v blatu in dobimo pravo prebavljivost hranljivih snovi zaužitega krmila (Orešnik in Kermauner, 2008).

- navidezna preb. = $(\text{zaužita kol. HS} - \text{z blatom izločena kol. HS}) / \text{zaužita kol. HS}$
- prebavljivostni koeficient = navidezna preb. * 100
- prava preb. = $((\text{zaužita kol. HS} - (\text{z blatom izl. kol. HS} - \text{kol. endogenih snovi})) / (\text{zaužita kol. HS})) * 100$

2.2.2 Vplivi na prebavljivost

Prebavljivost ni konstantna lastnost, ampak je odvisna od kemične sestave krmila ali hranljivih snovi, živalske vrste, količine zaužite krme in sestave oziroma predhodne obdelave krmil (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Kemična sestava krme ali hranljivih snovi

Hranljive snovi v obroku so različno prebavljive, poznani pa so tudi medsebojni učinki hranljivih snovi na prebavljivost. Surove beljakovine in maščobe spadajo med dobro prebavljive hranljive snovi. Topni ogljikovi hidrati so tudi dobro prebavljivi, zelo različno so prebavljive rudninske snovi. Najslabše prebavljiva je surova vlaknina, ki jo organizem brez pomoči mikroorganizmov v prebavnem traku ne more razgraditi (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Živalska vrsta

Vpliv živalske vrste povzroči največje razlike v prebavljivosti surove vlaknine. Pri monogastričnih živalih se delno prebavi v debelem črevesu (obseg razgradnje je odvisen od volumna debelega črevesa), pri prežvekovalcih pa je prebava v predželodcih usmerjena na surovo vlaknino. Razlike so odvisne od encimov, ki jih proizvajajo mikroorganizmi in nastajajo zaradi razlik v pogojih, ki vladajo v prebavilih. Količina zaužite surove vlaknine in njena kemična sestava spreminja prebavljivost same surove vlaknine in tudi vseh drugih hranljivih snovi, predvsem zato, ker so rastlinske celične stene v največji meri sestavljene iz surove vlaknine. Hranljive snovi znotraj celice postanejo dostopne oziroma se prebavijo šele potem, ko se razgradi surova vlaknina v celični steni. Z vsakim dodatnim odstotkom surove vlaknine v obroku se zmanjša prebavljivost organskih snovi (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Količina zaužite krme

Visoke statistične stopnje povezanosti med količino zaužite krme in prebavljivostjo so ugotovljene pri govedu. Zaradi povečanja zaužite količine krme in posledično hitrejšega prehoda hranljivih snovi skozi prebavila se prebavljivost poslabša. Pri vseh živalskih

vrstah prebavljivost zmanjšujejo prevelike količine beljakovin, maščob in nekaterih rudninskih snovi v obroku (Orešnik in Kermauner, 2008).

- Sestava obroka

Sestava obroka lahko vpliva na prebavljivost posameznih hranljivih snovi in s tem na prebavljivost različnih krmil v obroku. Vplivi so manjši pri živalih s pretežno encimatsko prebavo, zelo močni pa pri prežvekovalcih, kjer sestava obroka vpliva na rast in razvoj mikroorganizmov v predželodcih (Orešnik in Kermauner, 2008).

2.2.3 Prebavljivost pri laboratorijskih miših

V literaturi je zelo malo objav o primerjavi prebavljivosti med različnimi linijami laboratorijskih miši, več pa je objav o različnih prebavljivostnih poskusih, kjer so preizkušali učinke različnih snovi na telesno maso, sestavo telesa, prebavljivost in podobno.

Hastings in sod. (1997) so izvedli prebavljivostni poskus s samci linije F (miši selekcionirane na višji odstotek maščevja) in L (miši selekcionirane na nižji odstotek maščevja) iz 11. generacije. Poskus je potekal v dveh intervalih po 2 tedna in sicer pri starosti 4-6 tednov in kasneje pri 8-10 tednih, 2 tedna. V vsako metabolno kletko so namestili po dva samca, krmo so živali dobivale po volji (*ad libitum*), dnevno pa so zbirali izločke. Prebavljivost so ocenili glede na zaužito in izločeno suho snov. Ugotovili so, da med linijama ni statistično značilnih razlik v prebavljivosti suhe snovi.

V poskusu so Klaus in sod. (2005) preučevali vpliv EGCG (angl. *epigallocatechin gallate*), polifenola iz zelenega čaja, na debelost. Pri NZB (New Zealand black) miših so s krmo z visoko vsebnostjo maščob povzročili debelost, potem pa ji dodajali različne odstotke EGCG (0,5 % in 1,0 %). Prebavljivost so določili iz razlike med zaužito in izločeno energijo. Živali so individualno namestili v metabolne kletke za 4 dni in zbirali izločke. Ugotovili so, da je bilo hujšanje premosorazmerno s količino dodanega EGCG-ja. Količina zaužite krme se ni spremenila, povečala pa se je količina energije v iztrebkih, kar kaže na zmanjšano prebavljivost energije. Posledično se je dolgoročno zmanjšala absorpcija energije.

Keith in Bell (1988) sta pri miših ugotavljala pravo in navidezno prebavljivost dušika in aminokislin, iz čistih beljakovinskih virov. Uporabila sta 7 čistih beljakovin: kazein, želatino, *gliadin* (glikoprotein v pšenici), laktoalbumin, sojine beljakovine, zein (prolaminska beljakovina v koruzi) in ANRC (angl. »*Animal Nutrition Research Council*«) protein. Navidezna prebavljivost dušika v posameznem beljakovinskem viru in prebavljivost aminokislin je pokazala podoben trend. Navidezna prebavljivost suhe snovi vseh beljakovinskih virov, razen zeina, je bila 89-90 %, energije pa 91-92 %. Pri zeinu sta bili obe prebavljivosti 86 %. Prava prebavljivost dušika v ANRC proteinu, kazeinu, želatini in *gliadinu* je bila 97-98 %, pri laktoalbuminu in sojinih beljakovinah 94-96 % in 81 % pri zeinu. Prava prebavljivost aminokislin je bila v splošnem podobna pravi prebavljivosti dušika.

Hsu in sod. (1994) so preizkušali vpliv beljakovinskih virov in maščob na prebavljivost in sestavo telesa pri odraslih samicah miši. V poskusu so uporabili dve krmi in sicer pol-čisto in osnovno. Prva je vsebovala bodisi kazein ali izolirane sojine beljakovine (1 g/dan) in govejo mast (0-0,63 g/dan), osnovna krma pa 5 % koruznega olja, ogljikove hidrate, minerale in vitamine. Krma, ki je temeljila na sojinih beljakovinah je bila manj prebavljiva (energija in beljakovine) in je posledično vodila do nižje telesne mase in nižje koncentracije energije v telesu v primerjavi s krmo s kazeinom. Dodatek masti je povišal telesno maso živali, obenem pa zmanjšal prebavljivost (suha snov in energija), kar je povzročilo zmanjšanje mase telesnih beljakovin.

Park in sod. (2007) so preučevali vpliv na *in vivo* prebavljivost emulgiranih in zaščitenih (inkapsuliranih) maščob. 36 samcev, starih 4 tedne, so razdelili v štiri skupine in jih krmili štiri tedne. Krmili so jim štiri različne krme. A krma: neemulgirana maščoba, brez hitosana (hitosan pridobivajo iz hitina, ene glavnih sestavin celične stene gliv in skeleta členonožcev) (kontrola), B krma: neemulgirana maščoba, s hitosanom, C krma: emulgirana maščoba, brez hitosana in D krma: emulgirana maščoba, s hitosanom. Med skupinami ni bilo razlik v telesni masi, zauživanju krme, masi nekaterih organov in vsebnosti maščob v izločkih. Skupna absorpcija maščob je bila več kot 90 %. Rezultati so pokazali, da zaščitene maščobe s hitosanom ne zavirajo *in vivo* prebavljivosti, čeprav so prejšnje študije pokazale, da hitosan zavira *in vitro* prebavljivost.

V raziskavi, ki so jo opravili Ortmann in sod. (2003), so spremljali vpliv nekaterih makrohranil na presnavljanje energije in glukoze pri transgenih miših, ki so bile brez rjave tolšče. Prebavljivost energije so merili v metabolnih kletkah, kjer so bile živali individualno nameščene 7 dni, 2 dni za aklimatizacijo in 5 dni za poskus. Ugotovili so 80,6 % oziroma 94,3 % prebavljivost energije pri osnovnem tipu miši pri standardni krmi (5 % maščob) oziroma plosintetični krmi (10 % ogljikovi hidrati, 20 % beljakovine, 70 % maščobe) in 76,5 % oziroma 94,2 % pri miših brez rjave maščobe pri standardni krmi oziroma plosintetični krmi.

Hughes in Pitchford (2004) sta med drugim v svoji raziskavi opazovala prebavljivost kot neposreden odziv na selekcijo na zauživanje krme. Uporabila sta tri skupine miši. Miši selekcionirane na višje zauživanje krme, miši selekcionirane na nižje zauživanje krme in kontrolno skupino. Linija selekcionirana na nižje zauživanje krme je zaužila 7 % manj krme kot kontrolna skupina in 13 % manj kot linija selekcionirana na višje zauživanje. Miši selekcionirane na višje zauživanje krme so izločile 8 % več izločkov kot kontrolna skupina in kar 26 % več kot linija selekcionirana na nižje zauživanje krme. Gledano v celoti sta imeli kontrolna skupina in linija selekcionirana na višje zauživanjem krme za 16 % boljšo prebavljivost hranljivih snovi, kot linija z nižjim zauživanjem krme.

2.3 PREGLED OBJAV O LINIJAH FLI IN FHI

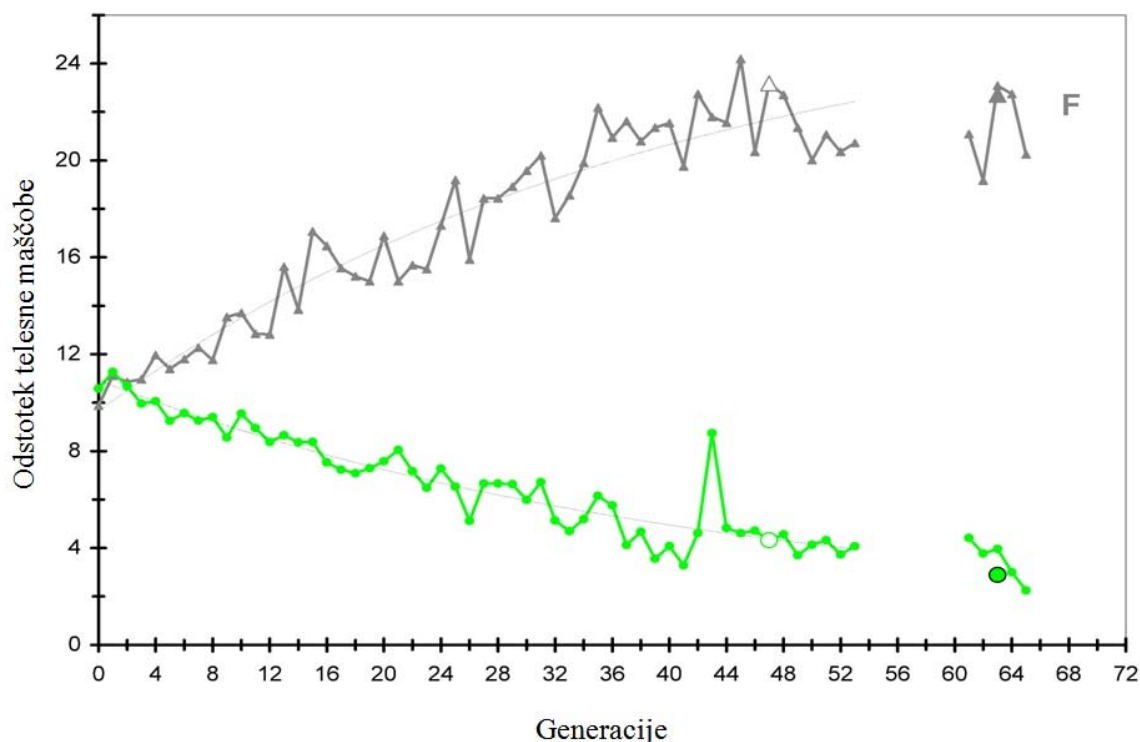
V poskusu smo spremljali prebavljivost hranljivih snovi pri miših selekcioniranih na višji odstotek maščevja ali linija FLI z oznako F (*fat*) in nižji odstotek maščevja ali linija FHI z oznako L (*lean*). Ti dve liniji miši izvirata iz laboratorija na Škotskem (Edinburgh) in sta rezultat več kot dvajset letne dvosmerne selekcije. V križanje so vključili dve inbridirani liniji JU in CBA ter genetsko heterogeno linijo CFLP. V prvi generaciji so paritve potekale naključno in so jo označili kot generacijo 0 (Sharp in sod., 1984).

Iz izhodiščne generacije 0 je nato selekcija potekala v treh ločenih selekcijskih poskusih, in sicer v poskusu A (apetit), poskusu F (debelost) in poskusu P (protein) (Sharp in sod., 1984). V poskusu A so bile živali selekcionirane glede na konzumacijo krme (višjo ali nižjo), v poskusu F glede na odstotek gonadalne maščobe, v poskusu P pa na telesno maso.

Končno število linij je bilo 27, saj so za vsako lastnost vzeli tri ponovitvene linije in tri selekcijske kriterije: višje ali *high* (H) so bile linije selekcionirane na podlagi povečanja opazovane lastnosti, nižje ali *low* (L) so bile linije selekcionirane na podlagi zmanjšanja opazovane lastnosti in še kontrolna linija (C) v kateri so bile paritve naključne in ni bila selekcionirana. Do osme generacije je vsako linijo sestavljalo 16 paritev, od osme dalje pa le še osem paritev (Sharp in sod., 1984).

Liniji FLI in FHI izhajata iz poskusa F. Živali so dvosmerno selekcionirali glede na višji (FLI) ali nižji (FHI) odstotek gonadalne maščobe pri samcih starih 10 tednov. To je maščobna zaloga okrog epididimisa (obmodka), ki jo lahko z disekcijo hitro in natančno določimo. Korelacija med gonadalno in skupno maščobo znaša 0,9, kar je bil tudi kriterij pri odbiru samcev z nižjim in višjim odstotkom gonadalnih maščob. Prvo obsežnejšo analizo fenotipskih sprememb pri poskusu F so naredili v 11. generaciji. Dvosmerni selekcijski odzivi v višji in nižji odstotek gonadalnih maščob so bili podobni. Pri liniji selekcionirani na višji odstotek se je le ta povečal za 36 %, pri liniji selekcionirani na nižji odstotek gonadalnih maščob pa se je zmanjšal za 44 % glede na kontrolne vrednosti (Sharp in sod., 1984).

V dvajseti generaciji so vse tri selekcijske ponovitve križali med seboj, da bi formirali eno linijo FLI (F) in eno linijo FHI (L) (Hastings in Hill, 1989; cit. po Horvat in sod., 2000). Po 53-ih generacijah parjenja je odstotek maščob v kontrolni populaciji znašal 10 %, pri liniji F se je povečal na 22 %, pri liniji L pa zmanjšal na 4 % pri 14 tednov starih samcih (Bünger in Hill, 1999).



Slika 2: Primerjava odstotkov telesne maščobe skozi 53 generacij dvosmerne selekcije (prirejeno po Bünger in Hill, 2005)

2.3.1 Fizična aktivnost pri linijah FLI in FHI

Raziskave v katerih so raziskovalci ugotavljali fizično aktivnost miši linij F in L so bile opravljene z namenom, ugotoviti ali prihaja do razlik v fenotipu med linijama, zaradi večje oziroma manjše fizične aktivnosti (Simončič, 2008). Bünger in sod. (2003) so z razliko v asimilarni energiji in tisti, ki jo živali porabijo med počitkom, predstavili količino energije, ki je potrebna za termoregulacijo in fizično aktivnost. Z vsemi zbranimi podatki so ugotovili, da več energije za fizično aktivnost in termogenezo, porabijo miši linije L.

Tou in Wade (2002) navajata kot vzrok za različno raven fizične aktivnosti vpliv prehrane, starosti, spola in genetski vpliv. Ker sta naši liniji razviti z dolgoročno selekcijo na višji oziroma nižji odstotek maščevja, nas zanima predvsem genetski vpliv.

Simončič in sod. (2008) so v poskusu merili fizično aktivnost linij F in L z uporabo hrčkovih koles. Medtem, ko se je pri liniji F fizična aktivnost s časom zmanjševala, se je

pri liniji L povečevala. Zauživanje krme je bilo večje pri liniji L in se je z aktivnostjo povečevalo. Miši linije L so prav tako preživele več časa v vertikalnem položaju oziroma so se več in dalj časa vzpenjale na zadnje okončine.

Obe liniji imata razvito neobičajno obrambo, ko sta izpostavljeni krmi z visokim deležem maščob. V takem primeru se odzoveta s spremembo v fizični aktivnosti. Linija F poveča fizično aktivnost in ne glede na nespremenjeno zauživanje krme povečuje telesno maso. Linija L pa zmanjša zauživanje krme in zadrži stopnjo fizične aktivnosti brez sprememb v telesni masi (Simončič in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

V letu 2003 sta bili liniji F in L pripeljani z Univerze v Edinburghu na Univerzo v Ljubljani. Sprva so bile nameščene v mišji koloniji na Veterinarski fakulteti, v aprilu 2004 pa premeščene v mišjo kolonijo na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete (Prevoršek, 2005).

V našem poskusu smo pri liniji F uporabili živali iz 48., 49. in 50. generacije, pri liniji L pa živali 46. in 48. generacije.

3.2 OSKRBA MIŠI

Pri delu v mišji koloniji je potrebno upoštevati določene zahteve, da preprečimo obolenja miši. Pred vstopom v mišjo kolonijo se je treba v garderobi preobleči v čisto obleko in obuti gumijaste škornje. Pred samim vstopom v kolonijo si škornje v barierah razkužimo in se pri vstopu ponovno preobujemo v gumijaste čevlje, ki se uporabljajo samo v koloniji. V koloniji si nadenemo na glavo mrežasto kapo, masko za usta in nos, gumijaste rokavice za enkratno uporabo in haljo, ki se prav tako uporablja samo za delo v koloniji.

Kolonija se deli na dva prostora. Prvi, glavni vhod, je tako imenovani čisti vhod, kjer prinašamo v prostor čiste in razkužene kletke, skozi drugi del pa iz kolonije odnašamo umazane kletke, izločene živali in vse ostale stvari, ki se ne smejo križati s čistimi potmi. Za razkuževanje se uporablja razkužilo VirkonS (KRKA, Slovenija).

3.2.1 Krma in voda

Dnevno smo pregledali in poskrbeli, da so imele živali ves čas na voljo zadostno količino vode in krme. Vodo so imele v plastičnih napajalnikih (200 ml) s kovinskim nastavkom v obliki stekleničke. Vodo smo pripravili v 50 litrskem sodu in ji dodali 37 % HCl tako, da je imela pH 3-4 in s tem zagotovili mikrobiološko neoporečnost. Tako pripravljeno vodo smo nalili v napajalnike.

Živali so imele krmo po volji, uporabljali pa smo krmo Altromin 1324, ki po deklaraciji vsebuje: 19,0 % surovih beljakovin, 4,0 % surovih maščob, 6,0 % surove vlaknine, 7,0 % surovega pepela, 0,9 % kalcija, 0,7 % fosforja, 5,0 mg bakra, 15.000 IE vitamina A, 600 IE vitamina D₃, 75,00 mg vitamina E.

3.2.2 Temperatura in vlaga zraka, svetloba

Živali v koloniji imajo 12 ur svetlobe, od 7. do 19. ure in 12 ur teme, ki se avtomatsko regulira. Med poskusom je bila povprečna temperatura zraka 21,5°C, relativna vlaga zraka pa 50-70 %.

3.2.3 Oprema

Uporabljali smo kletke (Techniplast, Italija) dimenzije 33 cm (dolžina) × 16 cm (širina) × 12,5 cm (višina). Kletke so bile pokrite z mrežo, kamor smo namestili napajalnike in dodajali krmo. V kletki so imele živali steljo (Lignocel, Nemčija). V preliminarnih poskusih so bile živali nameščene v metabolnih kletkah (Techniplast, Italija).

3.2.4 Čiščenje

Čiščenje kletk v mišji koloniji je potekalo enkrat tedensko. Že dan pred čiščenjem smo napolnili prazne kletke s svežo steljo. Pri čiščenju smo previdno eno po eno miš prestavili v čiste kletke in jih pokrili s čistim mrežnim pokrovom. Pretresli smo tudi pelete in zamenjali vodo, če je bilo to potrebno. Na čiste kletke smo tudi prenesli tablico s podatki o živalih, ki so v kletki. Pri menjavi smo bili pozorni na breje samice, samice z mladiči, zdravstveno stanje živali in morebitna opažanja zabeležili kot opombe.

Umazane kletke smo odstranili iz kolonije in jih v pralnici oprali v posebnem pomivalnem stroju. Po pranju smo opremo zložili nazaj v kolonijo in napolnili posodice za vodo. Po končanem čiščenju smo počistili tudi kolonijo in pred odhodom v prostoru s praznimi, očiščenimi kletkami prižgali UV luč, za še dodatno razkužitev in preprečitev okužb.

3.3 PRELIMINARNA POSKUSA

V februarju leta 2007 je bil opravljen preliminarni bilančni poskus v metabolnih kletkah na Oddelku za zootehniko. Devet samcev linije L in deset samcev linije F smo namestili v metabolne kletke in jim ponudili zdrobljeno, namočeno krmo Altromin. Po dveh dneh prilagoditve smo začeli spremljati porabo krme, telesno maso živali in količino izločenega seča in blata. Bilančni poskus je trajal 5 dni.

V avgustu istega leta, smo v mišji koloniji na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete, opravili drugi preliminarni poskus v metabolnih kletkah. Uporabili smo odvečne živali različnih linij. Poskus smo opravili z namenom, da bi ugotovili kako bi opravili dejanski poskus in se izognili možnim negativnim vplivom na živali (izguba teže živali, nezmožnost zauživanja krme in podobno). Uporabili smo 12 samcev (Preglednica 1), od tega smo jih v metabolne kletke 6 namestili v parih (3 pari), 6 pa individualno. Krmo smo jim ponudili v različnih oblikah, v peletih ali drobljenih ploščicah. Samce smo vsak dan tehtali in spremljali porabo krme. Poleg tega smo spremljali tudi katera oblika ponujene krme je najprimernejša in jo živali najlažje zauživajo. Po tednu dni smo vsem živalim ponudili zdrobljeno, namočeno krmo Altromin.

Preglednica 1: Živali v preliminarnem poskusu

Linija-generacija	Namestitev	ID	Odstavitev
E06-XFHL-29	Individualno	02Q (3c)	30.4.2007
E06-XFHL-29	Individualno	03Q (10c)	30.4.2007
E06-XFHL-29	Individualno	06P (11c)	28.5.2007
E06-XFHL-29	individualno	01P (31c)	11.4.2007
15FHG-6	V paru	05S (3c)	11.5.2007
15FHG-6	V paru	05R (1c)	11.5.2007
15FHG-6	V paru	05Q (30c)	11.5.2007
15FHG-6	V paru	05P (10c)	11.5.2007
E06-FLI-51	Individualno	02P (1c)	4.7.2007
FLI-48	V paru	020P (11c)	5.6.2007
FLI-48	V paru	021Q (33c)	5.6.2007
FHI-47	individualno	03R (33c)	12.6.2007

Po 14-ih dneh smo poskus prekinili, ker se živali niso dobro odzivale in niso primerno priraščale. Namestili smo jih nazaj v navadne kletke z nastilom.

3.4 PREBAVLJIVOSTNA POSKUSA

Zaradi ugotovljenega negativnega vpliva bilančnih kletk na prirast živali smo oba prebavljivostna poskusa izvedli v navadnih kletkah in se tako odrekli zbiranju seča in s tem meritvi bilance.

3.4.1 Poskus 1

V poskus 1 je bilo vključenih 21 samcev, od tega 11 samcev linije F in 10 samcev linije L (Preglednica 2). Živali so bile stare od 9 do 18,6 tednov, zato smo pri statistični obdelavi rezultatov v model vključili regresijo na starost.

Preglednica 2: Živali v poskusu 1 razvrščene po starosti ob začetku poskusa

Številka živali	Linija-generacija	ID	Rojstvo	Odstavitev	Starost (tedni)
1	FLI-49	024Q (30c)	25.6.2007	6.8.2007	15,0
2	FLI-48	024R (3c)	25.6.2007	6.8.2007	15,0
3	FLI-48	024P (10c)	25.6.2007	6.8.2007	15,0
4	FLI-49	07P (3c)	23.7.2007	13.8.2007	11,0
5	FLI-49	04R (3c)	25.6.2007	16.7.2007	15,0
6	FLI-49	04S (33c)	25.6.2007	16.7.2007	15,0
7	FLI-49	05P (10c)	27.6.2007	18.7.2007	14,7
8	FLI-49	08P (30c)	19.6.2007	30.7.2007	15,9
9	FLI-49	08R (1c)	19.6.2007	30.7.2007	15,9
10	FLI-50	02R (11c)	6.8.2007	27.8.2007	9,0
11	FLI-50	02S (40c)	6.8.2007	27.8.2007	9,0
13	FHI-46	025P (1c)	4.6.2007	29.6.2007	18,0
14	FHI-48	01P (11c)	31.5.2007	29.6.2007	18,6
15	FHI-48	01Q (33c)	31.5.2007	29.6.2007	18,6
16	FHI-46	029P (4c)	17.7.2007	8.8.2007	11,9
17	FHI-48	02P (10c)	21.7.2007	13.8.2007	11,3
18	FHI-48	03P (30c)	31.7.2007	21.8.2007	9,9
19	FHI-48	03R (40c)	31.7.2007	21.8.2007	9,9
20	FHI-48	03S (10c)	31.7.2007	21.8.2007	9,9
21	FHI-48	03T (1c)	31.7.2007	21.8.2007	9,9

3.4.2 Poskus 2

Poskus 2 smo naredili z namenom preveriti z neodvisno ponovitvijo rezultate poskusa 1, kjer so bile starosti živali neizenačene (višje). V ta poskus smo vključili 11 samcev linije F in 12 samcev linije L (Preglednica 3). Živali so bile stare od 9,6 do 11 tednov.

Preglednica 3: Živali v poskusu 2 razvrščene po starosti ob začetku poskusa

Številka živali	Linija-generacija	ID	Rojstvo	Odstavitev	Starost (tedni)
22	FHI-46	031P (3c)	6.8.2007	27.8.2007	11,0
23	FHI-46	031Q (1c)	6.8.2007	27.8.2007	11,0
24	FHI-46	031R (10c)	6.8.2007	27.8.2007	11,0
25	FHI-46	031S (30c)	6.8.2007	27.8.2007	11,0
26	FLI-49	09R (11c)	30.8.2007	26.9.2007	10,0
27	FLI-49	010P (10c)	31.8.2007	26.9.2007	9,9
28	FLI-49	010Q (4c)	31.8.2007	26.9.2007	9,9
29	FLI-48	026P(1c)	27.8.2007	20.9.2007	10,4
30	FLI-49	09P (1c)	30.8.2007	26.9.2007	10,0
31	FLI-49	09Q (3c)	30.8.2007	26.9.2007	10,0
32	FHI-48	05P (40c)	30.8.2007	2.10.2007	10,0
33	FHI-48	06P (11c)	30.8.2007	2.10.2007	10,0
34	FHI-48	07P (4c)	2.9.2007	2.10.2007	9,6
35	FHI-48	06Q (33c)	30.8.2007	2.10.2007	10,0
36	FLI-49	011Q (3c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
37	FLI-49	011R (40c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
38	FLI-49	011S (10c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
39	FLI-49	011T (30c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
40	FLI-49	011U (33c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
41	FHI-48	08P (1c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
42	FHI-48	08Q (3c)	11.9.2007	2.10.2007	10,3
43	FHI-46	033P (30c)	18.9.2007	2.10.2007	9,7
44	FHI-46	033Q (10c)	18.9.2007	2.10.2007	9,7

3.4.3 Delo v mišji koloniji – zbiranje blata

Ob začetku poskusa smo živali stehali in jih individualno namestili v čiste kletke s steljo. Prav tako smo stehali tudi krmo, ki so jo dobile. Zbiranje blata ene živali je potekalo pet dni. Vsak dan smo iz stelje pobrali blato in ga shranili v plastične, označene posodice. Čez noč smo posodice shranili v zamrzovalni skrinji. Živali smo dnevno tudi tehtali in dnevno beležili porabo krme.

3.4.4 Delo v laboratoriju – analiza blata

Analizo blata smo izvedli v kemijskem laboratoriju katedre za prehrano na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Po postopkih weendske analize smo določili vsebnost surovih maščob in surovih beljakovin.

- Priprava vzorca

Pred začetkom analiz smo vsak vzorec blata v tarilnici zdrobili in homogenizirali.

- Surove maščobe

Surove maščobe v vzorcu smo določili s tehtanjem suhega preostanka po ekstrakciji s petroletrom pri točno določenih pogojih. Najprej smo na analitski tehtnici stehali suhe destilirne bučke z mešalnimi kroglicami. Nato smo v ekstrakcijski tulec iz nemastnega papirja zatehtali 2,00 do 2,50 g vzorca in ga pokrili z vato. Tulce smo namestili na Soxhletov aparat, v bučke pa do približno 1/3 višine nalili petroleter in jih vstavili v Soxhletov aparat nad električne grelce. Čas ekstrakcije: 30 minut v petroletru, nato smo dvignili ekstrakcijske tulce iz petroletra in vzorec ekstrahirali še 30 minut s čistim topilom. Po končani ekstrakciji smo z rotavaporjem odparili topilo. Bučke z ekstraktom smo sušili 1 uro pri temperaturi 98°C, jih ohladili v eksikatorju in stehali. Določitve smo izvedli v dveh ponovitvah.

- Surove beljakovine (skupni dušik)

Vsebnost surovih beljakovin v vzorcu smo izračunali s pomočjo vsebnosti dušika v vzorcu, ki smo ga določili s Kjeldahlovo metodo. Pri tem smo predpostavili, da beljakovine vsebujejo 16 odstotkov dušika. Kjeldahlovo metodo za določanje dušika sestavljajo trije osnovni koraki:

1. Razklop vzorca v žveplovi (VI) kislini ob prisotnosti katalizatorja. Pri tem se organsko vezan dušik konvertira do amonijaka.
2. Destiliranje amonijaka v primerno raztopino.
3. Določitev množine predestiliranega amonijaka s titracijo.

Najprej smo na analitski tehtnici zatehtali približno 0,50 g vzorca in ga prenesli v Kjeldahlovo epruveto za razklop. K vzorcu smo dodali 1 žlico mešanice bakrovega sulfata in kalijevega sulfata ter 2×6 ml 96 % H_2SO_4 . Zmes smo dobro premešali. Pripravili smo tudi slepi vzorec tako, da smo v epruveto za razklop dodali vse reagentne brez vzorca.

Epruvete smo nato namestili v blok za segrevanje v digestoriju, ki je opremljen z absorberjem za pline, ki nastajajo pri oksidativnem razklopu. Po končanem razklopu smo raztopino ohladili in jo previdno razredčili z nekaj destilirane vode. Amonijak iz kisle raztopine smo po razklopu oddestilirali z uporabo destilacijske enote z destilacijo z vodno paro. Po razklopu vzorca, smo v epruveto za alkalni učinek, dodali 40 % vodno raztopino NaOH in pričeli z destiliranjem. Destilat smo ulovili v erlenmajerico, v katero smo dodali 60 ml 2 % vodne raztopine H_3BO_3 . Destilacija je potekala 3 minute. Nato smo erlenmajerico prestavili v titracijski aparat, ki je v destilat dodajal 0,05 M standardno raztopino H_2SO_4 , dokler ni raztopina dosegla vrednost pH 4,65. Z aparata smo odčitali porabo kisline.

3.5 OBDELAVA PODATKOV

V programu Excel smo opravili izračune posameznih parametrov glede na spodnje formule za obdobje petih dni:

- zaužit dušik (N) (g) = (zaužita krma (g) * vsebnost N v krmi (g/kg)) / 1000
- zaužite SB (g) = zaužit N (g) * 6,25
- zaužite SM (g) = (zaužita krma (g) * vsebnost SM v krmi (g/kg)) / 1000
- izločen N (g) = (vsebnost N v blatu (g/kg) * količina blata (g)) / 1000
- izločene SB (g) = izločen N * 6,25
- izločene SM (g) = (vsebnost SM v blatu (g/kg) * količina blata (g)) / 1000
- prebavljivost N (%) = ((zaužit N – izločen N) / zaužit N) * 100
- prebavljivost SM (%) = ((zaužite SM – izločene SM) / zaužite SM) * 100

Posamezne parametre prebavljivosti smo testirali v spodaj zapisanem modelu z metodo GLM (General linear model) v programu SAS (SAS/STAT, 1999-2001).

Model 1 (poskus 1): $y_{ij} = \mu + S_i + b_i (x_i - \bar{x}) + e_{ij}$

$y = \text{lastnost}$

$S_i = \text{skupina}, i=2$

$b_i = \text{regresija}, i=2$

$x_i = \text{starost}$

$e_{ij} = \text{ostanek}$

Model 2 (poskus 2): $y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij}$

$y = \text{lastnost}$

$S_i = \text{skupina}, i=2$

$e_{ij} = \text{ostanek}$

4 REZULTATI

4.1 PRELIMINARNA POSKUSA

V Preglednici 4 so podatki o vsebnosti hranljivih snovi v krmi, ki so jo dobivale živali v obeh preliminarnih poskusih in obeh prebavljivostnih poskusih.

Preglednica 4: Kemijska sestava krmne mešanice

	Altromin (g/kg)	Altromin (g/kg SS)
Suha snov	909,13	1000,00
Surove beljakovine	181,35	199,48
Surove maščobe	35,78	39,36
Surova vlaknina	70,73	77,80
Surovi pepel	67,55	74,30
Brezdušični izvleček	553,71	609,06
Fosfor	7,92	8,71
Kalcij	9,07	9,98
Magnezij	3,55	3,90
Kalij	10,59	11,65
Natrij	1,04	1,14

V času preliminarne bilančne poskusa (5 dni) je linija F izgubila za skoraj 4 g telesne mase, mišim linije L pa se masa praktično ni spremenila (Preglednica 5). Zauživanje krme je bilo precej višje pri liniji L (za 63 %), zato so bile tudi razlike med skupinama statistično značilne ($p=0,0001$).

Preglednica 5: Telesna masa živali in zaužita krma v preliminarne poskusu (povprečje ± standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Telesna masa na začetku poskusa (g)	23,99 ± 1,11	30,21 ± 3,82	< 0,0001
Telesna masa na koncu poskusa (g)	24,04 ± 0,85	26,40 ± 2,68	0,0010
Zaužita krma (g SS/dan)	7,42 ± 0,24	4,55 ± 0,50	< 0,0001

Živali v liniji F so zaužile manj krme in zato tudi manj dušika oziroma beljakovin (Preglednica 6). Količina izločenega blata je bila višja pri liniji L, koncentracija dušika v blatu pa pri liniji F. Miši linije L so z blatom izločile statistično značilno več dušika kot tiste iz linije F ($p=0,0005$). Koncentracija dušika v seču je bila večja pri liniji L in s tem

seveda tudi količina izločenega dušika na dan preko seča, kjer je razlika skoraj dvakratna v primerjavi z linijo F. Če pogledamo relativne vrednosti izražene glede na količino zaužite suhe snovi (SS) pa vidimo, da so živali iz linije L izločile manj dušika preko blata in več preko seča v primerjavi z linijo F, tako da je bil skupni izločen dušik izražen glede na zaužito suho snov enak pri obeh skupinah ($p=0,7954$).

Preglednica 6: Prebavljivost dušika v preliminarnem poskusu (povprečje \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužit N (mg/dan)	236,89 \pm 7,58	145,35 \pm 15,83	< 0,0001
Izločeno blato (g/dan)	5,38 \pm 0,31	3,37 \pm 0,30	< 0,0001
Vsebnost N v blatu (mg/g)	13,68 \pm 1,63	17,34 \pm 1,39	< 0,0001
Izločen N z blatom (mg/dan)	73,47 \pm 8,51	58,47 \pm 6,66	0,0005
Izločen N preko blata / g zaužite SS (mg/g)	9,89 \pm 0,96	12,90 \pm 1,44	< 0,0001
Izločen seč (g/dan)	9,39 \pm 1,37	6,47 \pm 1,06	< 0,0001
Vsebnost N v seču (mg/g)	14,16 \pm 1,60	10,35 \pm 1,37	< 0,0001
Izločen N s sečem (mg/dan)	131,20 \pm 8,15	66,38 \pm 10,34	< 0,0001
Izločen N preko seča / g zaužite SS (mg/g)	17,69 \pm 1,11	14,56 \pm 1,44	< 0,0001
Izločen N / g zaužite SS (mg/g)	27,57 \pm 0,97	27,46 \pm 0,88	0,7954

Bilanca dušika (koliko dušika je ostalo v telesu) v enem dnevu je bila statistično značilno boljša pri liniji L ($p=0,0008$). Prav tako je bila pri tej liniji boljša prebavljivost beljakovin v primerjavi z linijo F. Biološka vrednost beljakovin (delež od prebavljenega dušika) je bila statistično značilno boljša pri miših linije F ($p<0,0001$). Neto izkoristljivost beljakovin je bila nekoliko boljša pri liniji F ($p=0,0057$) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Prebavljivost beljakovin v preliminarnem poskusu (povprečje \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Bilanca N (mg/dan)	35,33 \pm 10,15	20,66 \pm 3,29	0,0008
Navidezna prebavljivost beljakovin (%)	69,02 \pm 3,02	59,58 \pm 4,51	< 0,0001
Biološka vrednost beljakovin (%)	26,10 \pm 5,93	35,53 \pm 3,78	< 0,0001
Neto izkoristljivost beljakovin (%)	19,13 \pm 4,09	21,35 \pm 0,92	0,0057

V Preglednici 8 vidimo, da so med skupinama statistično značilne razlike v količini zaužitih surovih maščob (zaradi razlik v zaužiti krmi) in prav tako v koncentraciji maščob v blatu ($p < 0,0001$). Miši linije L so zaužile več surovih maščob, imele pa so manjšo koncentracijo maščob v blatu, v primerjavi z linijo F. Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik v količini vseh izločenih surovih maščob z blatom v času poskusa ($p = 0,7642$). Izraženo glede na zaužito suho snov pa vidimo, da so miši linije F izločile več surovih maščob preko blata ($p < 0,0001$) in s tem je bila tudi prebavljivost surovih maščob statistično značilno boljša pri liniji L za več kot 7,5 % ($p < 0,0001$).

Preglednica 8: Prebavljivost maščob v preliminarnem poskusu (povprečje \pm standardna deviacija)

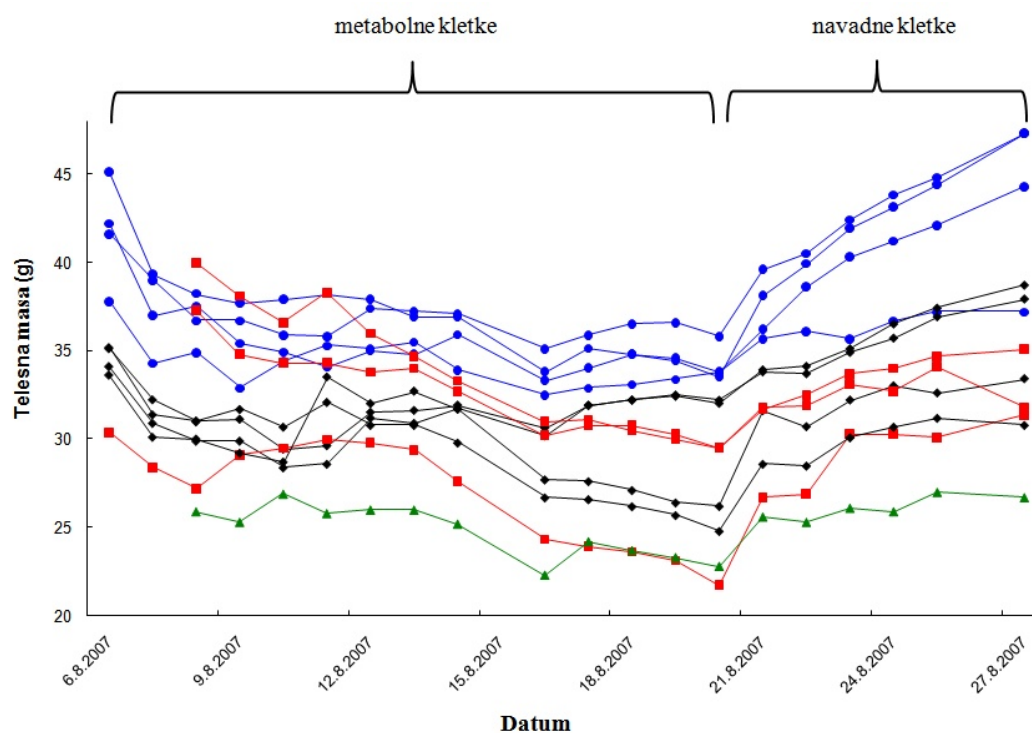
	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužite SM (mg/dan)	292,14 \pm 9,35	179,25 \pm 19,52	< 0,0001
Vsebnost SM v blatu (mg/g)	6,21 \pm 0,76	10,12 \pm 1,72	< 0,0001
Izločene SM z blatom (mg/dan)	33,32 \pm 3,09	33,98 \pm 5,81	0,7642
Izločene SM preko blata / g zaužite SS (mg/g)	4,49 \pm 0,42	7,49 \pm 1,14	< 0,0001
Prebavljivost SM (%)	88,59 \pm 1,06	80,98 \pm 2,88	< 0,0001

V preliminarnem poskusu v avgustu smo živalim ponujali različno obliko krme, dobivale pa so enako krmo kot pri prvem poskusu. Pri tem poskusu smo se osredotočili na telesno maso živali (Preglednica 9).

Preglednica 9: Sprememba telesne mase posameznih živali v preliminarnem poskusu (metabolne kletke, 14 dni)

Linija-generacija	Namestitev	Začetna telesna masa (g)	Končna telesna masa (g)	Sprememba v telesni masi (g)
E06-XFHL-29	Individualno	43,3	33,8	-9,5
E06-XFHL-29	Individualno	36,2	33,8	-2,4
E06-XFHL-29	Individualno	44,3	35,8	-8,5
E06-XFHL-29	Individualno	45,5	33,5	-12,0
15FHG-6	V paru	36,6	32,0	-4,6
15FHG-6	V paru	35,8	32,2	-3,6
15FHG-6	V paru	34,7	26,2	-8,5
15FHG-6	V paru	35,2	24,8	-10,4
E06-FLI-51	Individualno	31,7	21,7	-10,0
FLI-48	V paru	37,3	29,5	-7,8
FLI-48	V paru	40,0	29,5	-10,5
FHI-47	Individualno	25,9	22,8	-3,1

Kot vidimo na sliki 4 se je vsem živalim v metabolnih kletkah telesna masa v prvih dneh zelo znižala. Masa je najbolj padla pri miših z višjo začetno maso, saj so porabile telesne zaloge. Pri samcu linije L (FHI-47, zelena krivulja) je bil padec manjši, vendar je imel že na začetku nižjo maso in ni imel zalog, ki bi jih lahko porabil. Samce linije F označuje rdeča krivulja in tu vidimo, da je bil padec v telesni masi v prvih dneh veliko večji kot pri liniji L. Pri ostalih osmih samcih opazimo podoben trend, kljub temu, da so druge linije. Samce označene z modro krivuljo, bi lahko primerjali z linijo F, zaradi njihove visoke začetne telesne mase, tiste, označene s črno pa z linijo L. Po približno petih dneh se je izguba mase nekoliko umirila in se po desetih dneh ponovno povečala (izguba mase). Živali so po desetih dneh v metabolnih kletkah počasi začele pridobivati na telesni masi, vendar so že prej preveč izgubile tako, da smo poskus po štirinajstih dneh prekinili in jih namestili nazaj v navadne kletke s steljo. Po šestih dneh so pridobile nazaj vso maso, ki so jo izgubile.



Slika 3: Sprememba telesne mase posameznih živali v preliminarnem poskusu (navadne in metabolne kletke). Linija L (zelena barva), linija F (rdeča barva), linija FHG (črna barva), linija XFHL (modra barva)

4.2 PREBAVLJIVOSTNA POSKUSA

4.2.1 Poskus 1

Telesna masa se v času prvega prebavljivostnega poskusa pri obeh linijah miši praktično ni spremenila ($p=0,6338$). Med linijama je bila statistično značilna razlika v telesni masi ($p=0,0004$). Miši linije L so bile v povprečju za 7,4 g lažje od miši linije F (Preglednica 10). Zauživanje krme se prav tako ni statistično značilno razlikovalo med linijama. Živali pri obeh linijah so v času poskusa zaužile okrog 30 g krme oziroma povprečno 6 g /dan.

Preglednica 10: Telesna masa živali in zaužita krma v poskusu 1 (povprečje \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Telesna masa na začetku poskusa (g)	26,53 \pm 1,10	33,93 \pm 0,99	0,0004
Telesna masa na koncu poskusa (g)	26,71 \pm 1,11	34,04 \pm 1,00	0,0004
Sprememba telesne mase živali (g/5 dni)	0,18 \pm 0,18	0,12 \pm 0,16	0,6338
Zaužita krma (g/5 dni)	30,94 \pm 1,78	29,28 \pm 1,61	0,5988

Pri rezultatih o zaužitih in izločenih surovih beljakovinah med linijama ni bilo statistično značilnih razlik. Kljub temu pa je seštevek teh majhnih razlik pripeljal do statistično značilne razlike v prebavljivosti surovih beljakovin ($p=0,0415$). Miši linije F so zaužile 5,31 g surovih beljakovin oziroma 0,85 g dušika, linije L pa 5,61 g surovih beljakovin ali 0,90 g dušika (Preglednica 11). Vsebnost dušika v blatu se statistično ni razlikovala med skupinama. Prav tako se med skupinama ni razlikovala količina izločenega dušika. Pri liniji F je bila količina izločenega dušika 0,18 g, pri liniji L pa 0,17 g. Prebavljivost beljakovin je bila boljša pri miših linije L in sicer so prebavile 80,36 % dušika, miši linije F pa 78,21 % ($p=0,0415$).

Preglednica 11: Prebavljivost dušika v poskusu 1 (povprečje petih dni \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužit dušik (g)	0,90 \pm 0,05	0,85 \pm 0,05	0,5988
Izločeno blato (g)	8,16 \pm 0,35	8,75 \pm 0,32	0,4641
Vsebnost dušika v blatu (g/kg)	21,18 \pm 0,47	21,10 \pm 0,42	0,7291
Izločen dušik (g)	0,17 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,3697
Prebavljivost dušika (%)	80,36 \pm 0,78	78,21 \pm 0,70	0,0415

Med linijama ni bilo statistično značilnih razlik pri zauživanju maščob in pri količini izločenega blata (Preglednica 12). Obe liniji sta s krmo zaužili v petih dneh približno 1 g surovih maščob, linija F 1,05 g in linija L 1,11g. Koncentracija maščob v blatu je bila statistično značilno različna in tako se je posledično statistično značilno razlikovala tudi količina izločenih surovih maščob ($p=0,0012$). Miši linije F so v obdobju petih dni v povprečju izločile 0,13 g surovih maščob, linija L pa le 0,09 g. Prav tako kot pri

beljakovinah, so tudi maščobe bolje prebavile miši linije L in to za približno 4,6 %. Miši linije L so v poskusu absorbirale 92,02 % maščob, linija F pa le 87,41 % ($p=0,0004$).

Preglednica 12: Prebavljivost maščob v poskusu 1 (povprečje petih dni \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužite surove maščobe (g)	1,11 \pm 0,06	1,05 \pm 0,06	0,5988
Izloženo blato (g)	8,16 \pm 0,35	8,75 \pm 0,32	0,4641
Vsebnost surovih maščob v blatu (g/kg)	10,66 \pm 0,92	15,16 \pm 0,83	0,0080
Izložene surove maščobe (g)	0,09 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,0012
Prebavljivost surovih maščob (%)	92,02 \pm 0,65	87,41 \pm 0,59	0,0004

4.2.2 Poskus 2

Tudi pri tem poskusu je bila telesna masa med linijama statistično značilno različna ($p=0,0001$). Iz Preglednice 13 je razvidno, da se je v tem poskusu telesna masa živali rahlo povečala. Miši linije F so v povprečju pridobile 1,22 g, linije L pa 0,76 g. Zvišanje mase je bila posledica starosti živali, saj so bile še v fazi rasti. Zauživanje krme je bilo podobno pri obeh skupinah oziroma med njima ni bilo statistično značilnih razlik ($p=0,3038$).

Preglednica 13: Telesna masa živali in zaužita krma v poskusu 2 (povprečje \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Telesna masa na začetku poskusa (g)	24,27 \pm 0,54	29,83 \pm 0,56	0,0001
Telesna masa na koncu poskusa (g)	25,02 \pm 0,65	31,04 \pm 0,68	0,0001
Sprememba telesna mase živali (g/5 dni)	0,76 \pm 0,27	1,22 \pm 0,28	0,2487
Zaužita krma (g/5 dni)	26,87 \pm 1,27	28,81 \pm 1,33	0,3038

V drugem poskusu pri zauživanju beljakovin in posledično dušika, med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik (Preglednica 14). Prav tako se razlike niso pojavile pri vsebnosti dušika v blatu. Vendar, ker so obstajale razlike v količini izločenega blata, je med skupinama prišlo do statistično značilnih razlik v količini skupaj izločenega dušika oziroma surovih beljakovin ($p=0,0013$). Miši linije F so izločile 0,20 g dušika, medtem ko

so ga tiste iz linije L le 0,16 g. Prebavljivost dušika oziroma beljakovin je bila boljša pri liniji L, 78,88 %, kot pri liniji F, 75,90 % ($p=0,0071$).

Preglednica 14: Prebavljivost dušika v poskusu 2 (povprečje petih dni \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužit dušik (g)	0,78 \pm 0,04	0,84 \pm 0,04	0,3038
Izločeno blato (g)	8,17 \pm 0,34	9,74 \pm 0,36	0,0044
Vsebnost dušika v blatu (g/kg)	20,04 \pm 0,27	20,50 \pm 0,29	0,2567
Izločen dušik (g)	0,16 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,0013
Prebavljivost dušika (%)	78,88 \pm 0,69	75,90 \pm 0,72	0,0071

Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik v količini zaužitih surovih maščob ($p=0,3038$). Miši linije F so jih v povprečju zaužile 1,03 g, linije L pa 0,96 g (Preglednica 15). Statistično značilna razlika se je pokazala pri količini izločenega blata ($p=0,0044$) in prav tako pri skupni količini izločenih surovih maščob v blatu ($p=0,0185$). Posledično so se statistično značilne razlike pokazale tudi pri izločeni količini surovih maščob. Miši linije F so izločile 0,13 g, linije L pa 0,08 g surovih maščob. Prav tako kot v prvem poskusu, so tudi tu maščobe boljše prebavile miši linije L. Prebavljivost surovih maščob je pri liniji L znašala 91,61 %, pri liniji F pa 86,54 % ($p=0,0064$).

Preglednica 15: Prebavljivost maščob v poskusu 2 (povprečje petih dni \pm standardna deviacija)

	Linija L (suhe)	Linija F (debele)	P vrednost
Zaužite surove maščobe (g)	0,96 \pm 0,04	1,03 \pm 0,05	0,3038
Izločeno blato (g)	8,17 \pm 0,34	9,74 \pm 0,36	0,0044
Vsebnost surovih maščob v blatu (g/kg)	9,92 \pm 1,07	13,88 \pm 1,12	0,0185
Izločene surove maščobe (g)	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,0003
Prebavljivost surovih maščob (%)	91,61 \pm 1,16	86,54 \pm 1,21	0,0064

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšna je prebavljivost hranljivih snovi pri liniji L in liniji F. Osredotočili smo se na surove maščobe in surove beljakovine oziroma dušik.

5.1.1 Preliminarna poskusa

V prvem preliminarnem bilančnem poskusu, smo pri 9 samcih linije L in 10 samcih linije F spremljali porabo krme, telesno maso in količino izločenega seča in blata z namenom, da bi ugotovili prebavljivost dušika in maščob. Ugotovili smo, da so miši linije F zaužile manj krme in izgubile skoraj 4 g telesne mase, liniji L pa se masa ni spremenila. Glede na količino zaužite suhe snovi so živali linije L izločile manj N preko blata in več preko seča v primerjavi z linijo F. Med skupinama ni bilo razlik v skupnem izločenem dušiku glede na zaužito suho snov. Ker pa so živali linije L zaužile več krme so se pokazale statistično značilne razlike pri bilanci dušika in prebavljivosti beljakovin, kjer je bila boljša ta linija. Linija F je imela boljše vrednosti pri biološki vrednosti in neto izkoristljivosti beljakovin, kar pomeni, da kar se je dušika absorbiralo se je bolje izkoristilo pri liniji F, v primerjavi z linijo L, kljub temu da so med poskusom te živali hujšale. Prebavljivost surovih maščob je bila boljša pri liniji L za več kot 7,5 % in sicer 88,59 %, kar je bilo pričakovano, saj so živali med poskusom shujšale.

V drugem preliminarnem poskusu smo se osredotočili predvsem na spremembo v telesni masi. Telesna masa se je pri vseh poskusnih živalih hitro zmanjševala tako, da smo poskus prekinili. Ugotovili smo, da sta naši liniji miši zelo občutljivi na okolje v metabolnih kletkah, zato smo tudi naslednja prebavljivostna poskusa izvedli v navadnih kletkah in se tako odrekli zbiranju urina.

Zakaj so živali hujšale nismo ugotovili, saj smo poskušali različne načine, da bi to preprečili. Živalim smo ponujali različno krmo, prav tako tudi različno obliko krme. Uporabili smo živali različnih starosti, jih v kletke namestili v parih in individualno, uporabili različen čas prilagoditve in podobno.

V literaturi so v nekaterih prebavljivostnih poskusih uporabili metabolne kletke in niso opazili enakega učinka, tako da lahko potrdimo dejstvo, da sta naši liniji zelo občutljivi na pogoje v metabolnih kletkah. V poskusu, ki so ga v metabolnih kletkah izvedli Hastings in sod. (1997) se telesne mase pri miših niso zelo spremenile. Živali obeh linij so sicer izgubile telesno maso, vendar linija F le za 0,4 g, linija L pa 1,3 g. Potrebno pa je povedati, da so v tej raziskavi uporabili linije F in L na začetku selekcijskega poskusa (generacija 11), ko sta bili liniji genetsko zelo heterogeni in se med seboj v odstotku telesnih maščob še nista veliko razlikovali (Slika 2). V drugih raziskavah (Ortmann in sod., 2003), kjer so uporabili metabolne kletke, niso pa navedli začetne in končne telesne mase, ne moremo zaključiti, da tudi pri teh poskusih oziroma linijah ni prišlo do enakih negativnih učinkov na rast, kot pri naših linijah. V takih primerih je lahko interpretacija rezultatov prebavljivosti problematična.

Keith in Bell (1988) sta v svoji raziskavi miši namestila v posebne kletke s prozornim dnom, nagnjene za 45°, z gosto mrežo. Na mreži so se živali verjetno bolje počutile, nagib kletke pa je omogočal zbiranje izločkov. Urin sta zbirala z vpojnim papirjem.

Da bi se v prihodnje izognili težavam s hujšanjem linij F in L v metabolnih kletkah, bi lahko v prihodnje testirali določene postopke, s katerimi bi zmanjšali negativne učinke na rast naših linij. Tako bi lahko živali predhodno navajali na mrežna tla že v navadnih kletkah, ki so jih začeli prodajati pri Techniplast-u. Z uporabo teh mrež, bi se živali morda lažje navadile na kasnejše razmere v metabolnih kletkah. Poleg tega so se pred kratkim na trgu pojavile tudi posebne kletke za miši, ki imajo sistem zbiranja seča opremljen s takojšnjim ohlajevanjem. Pri našem poskusu smo, v primerjavi s količinami seča, ki bi jih glede na telesno maso tudi pričakovali, dobili značilno manjše količine. Do izgube seča je prišlo najverjetneje zato, ker se je prijel na stene spodnjega dela kletke, kjer so bili tudi ostanki razdrobljene krme. Zaradi razmeroma dolge poti polzenja seča v zbirne posode in neohlajanja vzorca, je verjetno do dodatnih izgub prišlo zaradi izhlapevanja.

5.1.2 Prebavljivostna poskusa

V prvem poskusu se telesna masa pri obeh linijah praktično ni spremenila, v drugem pa se je malo povečala, saj so bile miši mlajše in so bile v fazi rasti. Zauživanje krme se v obeh poskusih med linijama ni statistično značilno razlikovalo.

V prvem poskusu so bile starosti živali neizenačene, zato smo v model vključili regresijo na starost. Ugotovili smo, da tako maščobe, kot tudi dušik bolje prebavlja linija L, torej miši z manj telesnih maščob. To nismo pričakovali, kljub temu, da je že preliminarni poskus nakazal enak rezultat, vendar teh rezultatov zaradi omenjenega hujšanja nismo upoštevali. Med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik v količini zaužitih surovih maščob in količini izločenega blata. Statistično značilna razlika se je pokazala pri koncentraciji maščob v blatu in posledično pri količini izločenih surovih maščob. Prebavljivost maščob je bila za 4,6 % višja pri liniji L, saj so v času poskusa absorbirale kar 92,02 % maščob, medtem ko jih je linija F le 87,41 %. Pri surovih beljakovinah med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik v količini zaužitih in izločenih surovih beljakovinah. Seštevek majhnih razlik pa je pripeljal do statistično značilnih razlik v prebavljivosti. Vsebnost dušika v blatu in količina izločenega dušika se med skupinama ni statistično značilno razlikovala. Prebavljivost dušika pri liniji L je bila 80,36 %, pri liniji F 78,21 %.

Tudi v drugem poskusu, kjer so bile razlike v starosti živali manjše, smo dobili podobne rezultate kot pri prvem poskusu. Tudi v tem poskusu ni bilo statistično značilnih razlik v količini zaužitih surovih maščob, med skupinama. Statistično značilne razlike so se pokazale pri količini izločenega blata, pri skupni količini izločenih surovih maščob v blatu in izločeni količini maščob. Prebavljivost surovih maščob pri liniji L je bila boljša in je znašala 91,61 %, pri liniji F pa 86,54 %. Pri zauživanju surovih beljakovin med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik, prav tako se niso pojavile pri vsebnosti dušika v blatu. Ker so obstajale razlike v količini izločenega blata je prišlo do statistično značilnih razlik v količini skupaj izločenega dušika oziroma surovih beljakovin. Miši linije L so dušik prebavile 78,88 %, kar je 2,98 % bolje kot linija F, kjer smo ugotovili 75,09 % prebavljivost.

Glede na dobljene rezultate, lahko rečemo, da so rezultati obeh poskusov ponovljivi, kljub razlikam v starosti med prvo in drugo skupino poskusnih živali. V prihodnjih poskusih bi bilo zanimivo preveriti ali bi enake rezultate dobili tudi pri samicah naših linij.

Fenotipske razlike med linijama L in F torej ne moremo razlagati z razlikama v prebavljivosti med linijama. Še več, linija L absorbira še več dušika in bolje prebavlja maščobe kot debela linija F. Simončič s sodelavci (2008) je pokazal, da del fenotipskih razlik med linijama lahko razložimo z razlikami v fizični aktivnosti. Glede na indirektno izračune energetske bilance (Bünger in sod., 2003) pa lahko zaključimo, da celotno fenotipsko razliko med linijama (skoraj 20 % telesnih maščob) ne moremo razložiti samo s povišano fizično aktivnostjo linije L, ampak so najverjetneje vpletene tudi razlike v termogenezi in druge genetske/fiziološke razlike. Ker nam ni uspelo zagotoviti pogojev v bilančnih kletkah, v katerih bi se živali počutile udobno, nismo mogli preveriti kaj se dogaja po tem, ko so hranljive snovi absorbirane (presnova). So pa preliminarni rezultati pri dušiku pokazali, da živali linije F, kljub temu, da so shujšale uporabijo več absorbiranega dušika. Naslednje vprašanje, ki bi ga lahko preučevali na podlagi naše študije je ali obstajajo razlike v učinkovitosti metabolizma asimiliranih hranljivih snovi med linijama.

Ali prihaja do razlik med linijama tudi zaradi razlik v pretoku krme skozi prebavila in kakšne so razlike v dolžini tankega in debelega črevesa pri obeh naših linijah, so prav tako vprašanja, ki bi jih v nadaljnje lahko preučili. Ferraris in Vinnakota (1995) sta ugotovila, da pri miših C57BL/6J prihaja do statistično značilnih razlik v obsegu in teži tankega črevesa med debelimi in suhimi mišmi. Prav tako bi v nadaljnjih raziskavah morali v študijo vključiti tudi zbiranje seča in primerjati rezultate z našimi ugotovitvami.

5.2 SKLEPI

- Ugotovili smo, da sta naši liniji miši zelo občutljivi na pogoje v metabolnih kletkah.
- Zauživanje krme med linijama se statistično značilno ne razlikuje.
- Prebavljivost surovih beljakovin je boljša pri liniji L, v povprečju za 2,5 %.
- Prav tako linija L boljše prebavlja surove maščobe, v povprečju za 4,8 %.
- Z razlikami v prebavljivosti surovih beljakovin in surovih maščob torej ne moremo razložiti velikih fenotipskih razlik med linijama.

6 POVZETEK

Debelost v današnjem času predstavlja vse večji problem pri človeku, zaradi sprememb v prehranjevalnih navadah pa prav tako niso zaželeni zamaščeni domači živali.

V poskusu, ki smo ga izvedli na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete, smo preučevali, če obstajajo razlike v prebavljivosti hranljivih snovi med selekcijskima linijama miši, ki se 4-5 krat razlikujeta v deležu telesnih maščob. Uporabili smo dve liniji miši, linijo L in linijo F, ki izhajata iz Univerze v Edinburghu in sta plod 53 generacij dvosmerne selekcije na odstotek telesne maščobe. Po koncu selekcije sta se liniji močno razlikovali v tej lastnosti, saj je imela linija L le 4 %, linija F pa kar 22 % telesnih maščob od celotne telesne mase.

V času nastajanja diplomske naloge smo s preliminarnima poskusoma v metabolnih kletkah ugotovili, da sta naši liniji L in F zelo občutljivi na pogoje v omenjenih kletkah. Prebavljivostna poskusa smo zato izvedli v navadnih kletkah in se odrekli zbiranju seča in meritvi bilance. Rezultati so pokazali, da sta oba prebavljivostna poskusa zelo ponovljiva.

V pet dnevnom poskusu, smo dnevno zbirali blato, spremljali porabo krme in spremembo telesne mase živali. Blato smo ob koncu poskusa stehali in opravili analize. S statistično obdelavo podatkov v programu SAS s postopkom GLM smo testirali razlike med linijama. Ugotovili smo, da med linijama ni statistično značilnih razlik v zauživanju krme, so se pa pokazale statistično značilne razlike v prebavljivosti. Tako surove beljakovine, kot tudi surove maščobe je bolje prebavila linija L. Prebavljivost surovih beljakovin v obeh poskusih je pri liniji L znašala v povprečju 79,6 %, pri liniji F pa 77,1 %. Prebavljivost surovih maščob pa je bila v povprečju pri liniji L 91,8 %, pri liniji F pa 87,0 %.

Dobljeni rezultati kažejo, da fenotipskih razlik med linijama L in F ne moremo razlagati z razlikami v prebavljivosti, saj linija L asimilira celo več dušika in bolje prebavlja maščobe. Del fenotipskih razlik bi lahko pojasnili s povečano fizično aktivnostjo linije L, ki na ta način porabi več energije kot linija F, vpletene pa so verjetno tudi razlike v termogenezi in druge genetske oziroma fiziološke razlike.

7 VIRI

- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nature reviews: Genetics*, 6: 221-234
- Bünger L., Forsting J., McDonald K.L., Horvat S., Duncan J., Hochscheid S., Baile C.A., Hill W.G., Speakman J.R. 2003. Long-term divergent selection on fatness in mice indicates a regulation system independent of leptin production and reception. *The FASEB Journal*, 17, 1: 85-87
- Bünger L., Hill W.G. 1999. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight. *Mammalian Genome*, 10: 645-648
- Bünger L., Hill W.G. 2005. Unique resources for research into growth and obesity: Mouse lines selected for growth, fatness and food intake over 60 generations. University of Edinburgh. <http://homepages.ed.ac.uk/eang17/mice.pdf> (8.avg.2008)
- Echwald S.M. 1999. Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *Journal of Internal Medicine*, 254: 653-666
- Ferraris R.P., Vinnakota R.R. 1995. Intestinal nutrient transport in genetically obese mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 540-546
- Hastings I.M., Moruppa S.M., Bünger L., Hill W.G. 1997. Effects of selection on food intake in the adult mouse. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 114: 419-434
- Horvat S., Bünger L., Falconer V.M., Mackay P., Law A., Bulfield G., Keightley P.D. 2000. Mapping of obesity QTLs in a cross between mouse lines divergently selected on fat content. *Mammalian Genome*, 11: 2-7
- Hsu S.C., Hanson C.F., Owens F.N. 1994. Effects of protein source and tallow on digestibility and body composition in adult female mice. *FASEB Journal*, 8, 4: A172
- Hughes T.E., Pitchford W.S. 2004. Direct response to selection for post-weaning net feed intake in mice and correlated responses in post-weaning growth, intake, gross

digestibility and body composition. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44: 489-500

Keith M.O., Bell J.M. 1988. Digestibility of nitrogen and amino acids in selected protein sources fed to mice. *Journal of Nutrition*, 118: 561-568

Klaus S., Pültz S., Thöne-Reineke C., Wolfram S. 2005. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *International Journal of Obesity*, 29: 615-623

Morton N.M., Densmore V., Wamil M., Ramage L., Nichol K., Bünger L., Seckl J.R., Kenyon C.J. 2005. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 54: 3371-3378

Orešnik A., Kermauner A. 2008. *Osnove prehrane živali. Učbenik. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 134 str.*

Ortmann S., Prinzler J., Klaus S. 2003. Self-selected macronutrient diet affects energy and glucose metabolism in brown fat-ablated mice. *Obesity Research*, 11, 12: 1536-1544

Park G.Y., Mun S., Park Y., Rhee S., Decker E.A., Weiss J., McClements D.J., Park Y. 2007. Influence of encapsulation of emulsified lipids with chitosan on their in vivo digestibility. *Food Chemistry*, 104: 761-767

Prevoršek Z. 2005. Razvoj kongenih linij za natančnejše kartiranje kvantitativnega lokusa za nalaganje maščevja na kromosomu 15 pri miših. *Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 78 str.*

Rocha J.L., Eisen J.E., Van Vlack L.D., Pomp D. 2003. A large sample QTL study in mice: 2. Body composition. *Mammalian Genome*, 14: 100-113

SAS/STAT. 1999-2001. Cary, NC, USA, SAS Institute Inc.

Sharp G.L., Hill W.G., Robertson A. 1984. Effects of selection on growth, body composition and food intake in mice I. Responses in selected traits. *Genetical Research*, 43, 1: 75-92

- Simončič M. 2008. Molekularna in fiziološka osnova nalaganja maščevja pri poligenem modelu miši. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 121 str.
- Simončič M., Horvat S., Stevenson P.L., Bünger L., Holmes M.C., Kenyon C.J., Speakman J.R., Morton N.M. 2008. Divergent physical activity and novel alternative responses to high fat feeding in polygenic fat and lean mice. *Behavior Genetics*, 38, 3: 292-300
- Taylor A.T., Phillips S.J. 1997. Obesity QTL on mouse chromosome 2 and 17. *Genomics*, 43: 249-257
- Tou J.C., Wade C.E. 2002. Determinants affecting physical activity levels in animal models. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 8: 587-600

ZAHVALA

Ob zaključku se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Simonu Horvatu in somentorici doc. dr. Tatjani Pirman za vso strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in podporo pri delu in izdelavi diplomske naloge. Hvala vama za vse vzpodbudne besede in usmerjanje na poti k cilju.

Zahvaljujem se prof. dr. Janezu Salobirju za končni pregled diplomske naloge, dr. Nataši Siard in ge. Karmeli Malinger za pregled naloge in lektoriranje angleškega izvlečka.

Velika zahvala gre tudi tehnični sodelavki Ani Zanjkovič, mladi raziskovalki Zali Prevoršek in zdaj že bivšemu mlademu raziskovalcu Matjažu Simončiču za vso nesebično pomoč in podporo v času izvajanja poskusov in tudi za kasnejše nasvete in pomoč pri pisanju in oblikovanju naloge.

Za pomoč pri laboratorijskih analizah se zahvaljujem tehničnemu sodelavcu Marku Kodra in ostalim zaposlenim na Katedri za prehrano za gostoljubnost in pomoč.

Zahvalila bi se tudi ge. Sabini Knehtl za pomoč pri vseh formalnostih v zvezi z diplomsko nalogo in študijem.

Zahvaljujem se sestri Darji za podporo in mali Ajši za potrpežljivost in vse trenutke miru. Prav tako se zahvaljujem Gorazdu za vzpodbudo in potrpežljivost.

Predvsem pa se ob zaključku študija zahvaljujem mami Martini, ki mi je vsa ta leta stala ob strani in mi nudila finančno in psihično podporo v težkih trenutkih, da sem postala to kar sem. Mami, v zahvalo ti posvečam to diplomsko delo. Hvala.