MENOUFIA JOURNAL OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	Biochemical studies on the metabolism of some fatty acids
Name of Applicant	**:**	Mohamed Magdy Darwish Shabana
Scientific Degree	**:**	Ph.D.
Department	**:**	Agricultural Biochemistry
Field of study	**:**	Agricultural Biochemistry
Date of Conferment	**:**	May 15, 2024

Supervision Committee:

- Dr. F. M. El-Shouny : Prof. of Agric Biochemistry, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. S. A. El-Kadousy : Prof. of Agric Biochemistry, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. M. M. Abozid : Prof. of Agric Biochemistry, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

SUMMARY

This study was carried out to investigate the protective effect of blended vegetable oils, consists of chia seed and sunflower oils, with varying ratios of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), on lipid profile, liver functions, adipocyte functions. and evaluating the hepatic bioconversion of alpha-linolenic acid (ALA,18:3, n-3) to eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3), in rats with or without having high-fat diet.

The data of this study can be summarized as follows:

1st: Physical and chemical characteristics of chia seed and sunflower oils:

Physiochemical properties of chia seed and sunflower oils showed that:

Specific gravity 0.93, color (red) 0.75, refractive index 1.48, acid value 1.03(mgKOH/g oil), saponification value 194.05(mgKOH/g oil), ester value 193.02, iodine value 189.5(gI_2/100g oil), peroxide value 0.85(meq oxygen/kg), total unsaponifiable matter 1.22%, and stability induction period at (120°C in hour),3.94 are the values associated with chia seed oil. While sunflower oil has refractive index 1.47, color (red) 0.95, specific gravity 0.92, acid value 1.27(mgKOH/g oil), saponification value 191.91(mgKOH/g oil), ester value 190.64, iodine value 120.6(gI_2/100g oil), peroxide value 0.76(meq oxygen/kg), total unsaponifiable matter 2.15% and stability induction period at (120◦C in hour) 4.86.

2nd: Sterols and fatty acids composition of chia seed and sunflower oil:

A- GC.MS fractionation of sterols in chia seed and sunflower oils showed that:

Chia seed oil contains β-sitosterol as the main sterol which reached 46.61%, followed by stigmasterol 19.55%, campesterol16.93%, then delta-5-avenasterol 10.2%, and lanosterol 6.71%. While sunflower oil contains β-sitosterol as the main sterol which reached 57.63%, followed bydelta-7-stigmasterol 15.02%, stigmasterol 9.7 %, thencampesterol9.5 %, delta-7-avenasterol 4.25%, and delta-5-Avenasterol 3.9%

B- GC fractionation of fatty acids in chia seed and sunflower oils showed that:

Chia seed oil contains alpha-linolenic acid as the main fatty acid which reached 61.29%, followed by linoleic acid 18.35%, then oleic acid 8.49%, and finally palmitic and stearic acid (6.71% and 4.39%, respectively). While sunflower oil contains linoleic acid as the main fatty acid which reached 55.87%, followed by oleic acid 25.71%, then palmitic acid 10.09%, and finally stearic, gama-linolenicand alpha-linolenic acid (4.88%, 2.11% and 0.93% respectively).

3rd: Biochemical evaluation of the effect of different n-6/n-3 PUFAs ratios diets on lipid profile, liver functions, and adipocyte functions in rats that were fed a high-fat diet.

This experiment was designed to evaluate the effect of different n-6/n-3 PUFAs ratios diets (1:1, 5:1, and 10:1) on lipid metabolism and liver functions in rats that were fed a high-fat diet for 10 weeks.

The obtained results can be summarized as follows:

1- All studied groups of 1:1, 5:1, and 10:1 n-6/n-3 PUFAs ratios diets lowered significantly body weight gain, weight of tested organs: liver, kidneys, and heart of rats, serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), very low-density lipoprotein cholesterol (vLDL-c), risk ratio, atherogenic index, adiponectin (ADPN) levels, and lipoprotein lipase (LPL) activity than those of the positive control group and the lowest values of them were for 1:1group then 5:1 and 10:1 groups.

2- Serum vLDL-c, ADPN, free fatty acids (FFA) and LPL levels in the 1:1 and 5:1 groups were significantly lower than those in the 10:1, negative and positive control groups and the lowest of them was those of 1:1 group.

3- The 10:1 group had significant high levels for serum high-density lipoprotein cholesterol HDL-c, FFA and ADPN levels than those in the negative control group.

4- All studied groups of 1:1, 5:1, and 10:1 n-6/n-3 PUFAs ratios diets had significant high values for serum leptin levels compared with positive and negative control groups and the highest of them was that of 10:1 group then 5:1 and 1:1 groups.

5- Positive control group was exposed to be hyperlipidemic group which led to significant increase in the enzymes activities of liver functions aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH)activities and alkaline phosphatase (ALP), but total protein and albumin contents were significantly decreased. All studied groups of 1:1, 5:1, and 10:1 n-6/n-3 PUFAs ratios diets have a protective effect against hyperlipidemia and improved the activities of AST, ALT, ALP and LDH with increasing total protein and albumin contents than those of the positive control group and the best of them was 1:1group then 5:1 and 10:1 groups.

Blended oils with a low n-6/n-3 PUFAs ratio improved metabolic disorders by regulating lipid metabolism. Consequently, that ratio had favorable effects on metabolic profiles in rats fed on high-fat diet-fed rats specially of the ratio of 1:1 n-6/n-3.

4th: Evaluation the effect of different n-6/n-3 PUFAs ratios diets on the hepatic bioconversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and also investigating their effects on lipid profile and liver functions, compared to control diet:

The animals were divided into four groups. First fed on standard diet and saved as control group; second group fed on diet contain 1:1 n-6/n-3 PUFAs ratio, third group fed on diet contain 5:1 n-6/n-3 PUFAs ratio and fourth group fed on diet contain 10:1 n-6/n-3 PUFAs ratio by blended oils as oil source. The experiment was carried out for 10 weeks.

The obtained results can be summarized as follows:

1-Blended oils with 1:1 and 5:1 n-6/n-3 PUFAs ratio significantly decreased rat's body weight gain and weight of organs (liver, heart, and kidney) compared with mixed oils with 10:1 n-6/n-3 PUFAs ratio and control groups and the most influential one was that of 1:1 n-6/n-3 PUFAs ratio.

2- The 1:1 and 5:1 groups showed a significant decrease in serum TG, TC, LDL-c, vLDL-c, risk ratio, and atherogenic index. On the other hand, they showed a significant increase in serum HDL-c compared with10:1and control groups and the most effective of them was 1:1 group.

3- The 1:1 group showed a significant decrease in serum AST and ALT activities compared with control, also the 1:1and 5:1 ratio groups showed significant decrease in serum ALP activity compared with control. On the other hand, the 1:1, 5:1 or 10:1 groups showed significant decrease in serum LDH activity compared with control. Finally, the groups of 1:1 and 5:1 n-6/n-3 PUFAs ratios showed significant increase in serum albumin and total protein levels compared with control.

4- Eiccosapentaenoic acid (EPA, C20:5, omega-3) was detected in the liver's lipid of the 1:1, 5:1or 10:1 groups (4.14 %, 2.6%, and0.05%respectively), while docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, omega-3) was detected only in the liver's lipid of 1:1 and 5:1 groups(3.08% and 1.09% respectively).

It could be concluded that feeding rats on diets rich in ALA, (C18:3, n-3) or have a covenant value of n-6: n-3 ratio such as 1:1 was the most effective in elevating EPA and DHA biosynthesis with improvement of blood lipid profile and liver functions compared with the control group.

عنوان الرسالة: دراسات كيميائية حيوية على التمثيل الغذائي لبعض الأحماض الدهنية
اسم الباحث : محمد مجدي درويش شبانة
الدرجة العلمية: دكتوراة الفلسفة فى العلوم الزراعية
القسم العلمى : الكيمياء الحيوية
تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٤/٥/١٥
لجنة الإشراف: أ.د. فؤاد مطاوع الشوني أستاذ الكيمياء الحيوية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د. سمير عبد القادر القدوسي أستاذ الكيمياء الحيوية الزراعية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د. مدحت مصطفى أبوزيد أستاذ الكيمياء الحيوية ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

الملخص العربي

أجريت هذه الدراسة لبحث التأثير الوقائي لمجموعة من خلطات زيوت بذور الشيا وعباد الشمس(للحصول على نسب محددةمن الأحماض الدهنية الأساسيةاوميجا-٦: اوميجا-٣)، عن طريقتغذية جرذان التجارب على نظام غذائي متزنوأخريحتوي على نسبة عالية من الدهون، على مؤشرات دهون الدم، ووظائف الكبد، ووظائف الخلايا الدهنية،وكذلك تقييم التحول الحيوي في الكبد لحامض ألفا لينولينيك(أوميجا -٣) إلى إلي الأحماض الدهنية إيكوزابينتانويك (أوميجا-٣) ودوكوزاهيكسانويك (أوميجا-٣).

يمكن تلخيص نتائج هذه الدراسة فيما يلي:

أولا: الخواص الكيميائية والفيزيائية لزيوت بذور الشيا وعباد الشمس:

أظهرت نتائج الخواص الفيزوكيميائية لزيوت بذور الشيا وعباد الشمس ما يلي:

زيت بذور الشيا: له معمل انكسار ١,٤٨، ودرجة لون أحمر٠,٧٥، وكثافه نوعيه ٠,٩٣، ورقم حامض ١,٠٣ ملجم KOH/ جم زيت، ورقم تصبن ١٩٤,٠٥ ملجم KOH/ جم زيت ورقم إستر ١٩٣,٠٢ملجم KOH/ جم زيت ورقم يودي١٨٩,٥ جم/$I_2$١٠٠جم زيت ورقم بيروكسيد ٠,٨٥مللي مكافئ الأكسجين/كجم زيت ومواد غير متصبنه ١,٢٢%وفترةالثباتيهعند التعرض الى ١٢٠ درجة مئوية في الساعة كانت٣,٩٤ ساعة.

زيت عباد الشمس: له معمل انكسار ١,٤٧، ودرجة لون أحمر٠,٩٥، وكثافه نوعيه ٠,٩٢، ورقم حامض ١,٢٧ملجم KOH/جم زيت، ورقم تصبن ١٩١,٩١ملجم KOH/ جم زيت، ورقم إستر ١٩٠,٦٤ملجم KOH/ جم زيت، ورقم يودي١٢٠,٦جم/I_2 ١٠٠جم زيت، ورقم بيروكسيد ٠,٧٦ملليمكافئ الأكسجين/كجم زيت، ومواد غير متصبنه ٢,١٥%، وفترةالثباتيهعند التعرض إلى ١٢٠ درجة مئوية في الساعة كانت٤,٨٦ ساعة.

ثانيا: محتوي زيوت بذور الشيا وعباد الشمس من الإستيرولات والأحماض الدهنية:

أ– تفريد محتوي زيوت بذور الشيا وعباد الشمس من الإستيرولات بواسطة جهاز GC.MS

زيت بذور الشيا: يحتوي على بيتا-سيتوستيرول كإستيرول رئيسي بنسبة ٤٦,٦١%، يليه ستيجماستيرول ١٩,٥٥%، كامبستيرول ١٦,٩٣%، ثم دلتا-٥-أفيناستيرول ١٠,٢%، ولانوستيرول ٦,٧١% من الإستيرولات الكلية.

زيت عباد الشمس: يحتوي على بيتا سيتوستيرول كإستيرول رئيسي بنسبة ٥٧,٦٣%، يليه دلتا-٧-ستيجماستيرول ١٥,٠٢%،ستيجماستيرول ٩,٧%، كامبستيرول ٩,٥%، دلتا-٧-أفيناستيرول ٤,٢٥%، ودلتا-٥-أفيناستيرول ٣,٩ .%من الإستيرولات الكلية.

ب- تفريد محتوي زيوت بذور الشيا وعباد الشمس من الأحماض الدهنية بواسطة جهاز GC:

زيت بذور الشيا: يحتوي على حمض ألفا لينولينيك كحمض دهني رئيسي بنسبة ٦١,٢٩%، يليه حمض اللينوليك ١٨,٣٥%، ثم حمض الأوليك ٨,٤٩%، وأخيراً حمض البالمتيك وحمض الإستياريك بنسبة ٦,٧١% و٤,٣٩% على التوالي.

زيت عباد الشمس: يحتوي على حمض اللينوليك كحمض دهني رئيسي بنسبة ٥٥,٨٧%، يليه حمض الأوليك ٢٥,٧١%، ثم حمض البالمتيك ١٠,٠٩%، وأخيراً حمض الإستياريكو حمض جاما لينولينك وحمض ألفا لينولينيك بنسبة ٤,٨٨%، ٢,١١%،٠,٩٣%على التوالي.

ثالثاً: التقييم الكيميائي الحيوي لتأثير نسب مختلفة من من الأحماض الدهنيةاوميجا-٦: اوميجا-٣على دهون الدم، ووظائف الكبد، ووظائف الخلايا الدهنية في الجرذان التي تم تغذيتها على نظام غذائي مرتفع الدهون:

تم تصميم هذه التجربة لتقييم تأثير الأنظمة الغذائية المختلفة التي تحتوي على نسبمختلفة مناوميجا-٦: اوميجا-٣علىدهون الدم، ووظائف الكبد، ووظائف الخلايا الدهنية في الجرذان التي تم تغذيتها على نظام غذائي مرتفع الدهون لمدة ١٠ أسابيع.

يُمْكِنُ تَلخيص النَتائِج كالتّالي:

١- جميع المجموعات التي تمت دراستها والتي تحتوي على نسب مختلفة (١:١، ١:٥، ١:١٠) من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع PUFAs أوميجا٦: أوميجا ٣ كان لها تأثير ملحوظ في انخفاض ما يلي: زيادة وزن الجسم، وزن الأعضاء التي تم اختبارها: (الكبد والكلية والقلب) في الجرذان،الدهون الثلاثية(TG)، الكوليسترول الكلي(TC)، كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL-c)، كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة جدًا(vLDL-c)، نسبة الخطر، مؤشر تصلب الشرايين، مستويات الأديبونيكتين(ADPN) ، وليبيز البروتين الدهني(LPL) مقارنة بمجموعة الكنترول الإيجابيوكان أكثرهم تأثيرالمجموعة ذات النسبة ١:١ ثمالمجموعة ذات النسبة١:٥والمجموعة ذات النسبة ١:١٠.

٢- كانت مستوياتVLDL-c و ADPN والأحماض الدهنية الحرة (FFA) و LPL في مصل الدم في المجموعات ذات النسبة ١:١ و١:٥ أقل بشكل ملحوظ من تلك الموجودة في المجموعة ذات النسبة١:١٠ و مجموعتي الكنترول السلبي والإيجابي ومن بين المجموعتينذات النسبة١:١ و١:٥ كانت المجموعة ذات النسبة١:١هي الاقل.

٣-كانت لدى المجموعةذات النسبة ١:١٠ مستويات كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافةHDL-c و FFA و ADPN أعلى بشكل ملحوظ من تلك الموجودة في مجموعة الكنترول السلبي.

٤- جميع المجموعات المدروسة والتي تحتوي على ننسب مختلفة من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع PUFAs أوميجا٦: أوميجا٣ (١:١، ١:٥، ١:١٠)كان لديها مستويات أعلى بشكل ملحوظ من هرمون الليبتين في الدم مقارنة مع مجموعات الكنترول السلبي والإيجابي وكانت أعلاهاالمجموعة ذات النسبة ١:١٠ثم المجموعتينذات النسب ١:٥و١:١.

٥- مجموعة الكنترول الإيجابي تعرضت لارتفاع نسبة الدهون في الدم مما أدى إلى زيادة معنوية في نشاط إنزيمات الكبد مثل الأسبارتات ترانس أمينيز(AST) ، الألانين ترانس أمينيز(ALT) ، اللاكتات ديهدروجينيز (LDH) والفوسفاتيز القلوي (ALP)، وانخفاض كل من البروتين الكلي والألبومين بشكل ملحوظ. أظهرت جميع المجموعات المدروسة والتي تحتوي على ننسب مختلفة من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع PUFAs أوميجا٦: أوميجا٣ (١:١، ١:٥، ١:١٠)تأثيرا وقائيا ضد زيادة دهون الدم وتحسن في نشاط انزيمات الكبد AST و ALTوALPوLDHمع زيادة البروتين الكلي والألبيومين مقارنة بمجموعة الكنترول الإيجابي وكان أفضلهم المجموعة ذات النسبة ١:١ ثم المجموعات ذات النسب١:٥ و١:١٠.

تعمل الزيوت المخلوطة التي تحتوي على نسبة منخفضة من الأحماض الدهنية غير المشبعة(اوميجا٦: اوميجا٣)على تحسين الاضطرابات الأيضية من خلال تنظيم التمثيل الغذائيللدهون.بالإضافة إلى ذلك، كان للنسب المنخفضة

من(اوميجا٦: اوميجا٣)آثار إيجابية على الملامح الأيضية في الجرذان التي تتغذى على نظام غذائي عالي الدهون وخاصة نسبة ١: ١(اوميجا٦: اوميجا٣).

رابعا: تقييم تأثير الأنظمة الغذائية ذات النسب المختلفة من الأحماض الدهنيةاوميجا-٦: اوميجا-٣على التحول الحيوي الكبدي لحمض ألفا لينولينيك إلى حمض إيكوسابنتاينويك وحمض دوكوساهيكسينويك ودراسة التأثير على دهون الدم ووظائف الكبد، مقارنة بالكنترول الطبيعي:

تم تقسيم الحيوانات إلى أربع مجموعات،المجموعة الأولى تم تغذيتها على نظام غذائي قياسي وحفظها كمجموعة كنترول؛ المجموعة الثانية تغذت على وجبة تحتوي على (نسبة ١:١ اوميجا-٦: اوميجا-٣)، المجموعة الثالثة تغذت على وجبة تحتوي على (١:٥ نسبة اوميجا-٦: اوميجا-٣) والمجموعة الرابعة تغذت على وجبة تحتوي على (١:١٠ نسبة اوميجا-٦: اوميجا-٣) بواسطة الزيوت المخلوطة كمصدر للزيت .تم تنفيذ التجربة لمدة١٠ أسابيع.

يُمْكِنُ تَلخيص النَتائِج كالتّالي:

١- أدت الزيوت المخلوطة التي تحتوي على النسبة ١:١ و١:٥من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع PUFAs أوميجا٦: أوميجا٣ إلى انخفاض ملحوظ في وزن جسم الفئران ووزن الأعضاء (الكبد والقلب والكلى) مقارنة بـخليط الزيوت المحتوي على النسبة ١:١٠ والكنترول وكان الأكثر تأثيرًا هو خليط الزيوت المحتوي على النسبة ١:١.

٢- أظهرت المجموعتان ذات النسبة ١:١ و١:٥ (اوميجا٦: اوميجا٣)انخفاضًا ملحوظًا في TG، TC، LDL-c، vLDL-c، ونسبة الخطر، ومؤشر تصلب الشرايين.ومن ناحية أخرى أظهرت زيادة معنوية في مستوىHDL-c في مصل الدم مقارنة مع المجموعة ذات النسبة ١:١٠اوميجا٦: اوميجا٣ ومجموعة الكنترول وكانت المجموعة الأكثر انخفاضا هي المجموعة ذات النسبة ١:١ اوميجا٦: اوميجا٣.

٣- خفضتالمجموعة ذات النسبة ١:١ اوميجا٦: اوميجا٣بشكل ملحوظ مستويات ALTوAST فيمصل الدم مقارنة مع مجموعة الكنترول، كما أظهرت مجموعة ١:١اوميجا٦: اوميجا٣ و مجموعة ١:٥اوميجا٦: اوميجا٣ انخفاضاً معنوياً في مستويات ALP في مصل الدم مقارنة مع الكنترول.من ناحية أخرى، أظهرت الثلاث مجموعات تحت الدراسة انخفاضًا ملحوظًا في مستويات LDH في مصل الدم مقارنة مع مجموعة الكنترول.أخيرًا، أظهرت المجموعات ذاتالنسب ١:١و١:٥اوميجا٦: اوميجا٣زيادة ملحوظة في مستوياتالألبيومين والبروتين الكلي في مصل الدم مقارنة مع مجموعة الكنترول.

٤- أظهرت النتائج وجود الحمض الدهني ايكوزابنتانويك (EPA C20:5 n-3) في دهون الكبد الخاصة بالمجموعات تحت الدراسة ذات النسب ١:١ و١:٥ و ١:١٠ اوميجا٦: اوميجا٣بنسبة (٤,١٤%، ٢,٦%، و٠,٠٥% على التوالي)، بينما ظهر الحمض الدهني ديكوزاهكسانويك (DHA C22:6 n-3)فقط في دهون الكبد للمجموعتين ذات النسب ١:١ و١:٥اوميجا٦: اوميجا٣بنسبة (٣,٠٨% و١,٠٩% على التوالي).

وبناء عليه يمكن استنتاج أن تغذية الجرذان بالوجبات الغذائية المحتويةعلى مستوى مرتفع من حمض الألفا لينولينك (ALA C18:3, n-3) أو قيمه مناسبةللنسبة بين أوميجا- ٦: أوميجا - ٣ مثل النسبة ١:١ أظهرت فعالية جيدةفي تحسين تمثيل الدهون في الدم وكذلك وظائف الكبد مقارنة بالكنترول الطبيعيكم أنها أدت إلي زيادة كمية الأحماض الدهنية إيكوزابنتانويك (EPA C20:5, n-3) وديكوزاهكسانويك (DHA C22:6, n-3) المخلقة في الكبد.