

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urška TOMAŽIN

**VLOGA α - IN γ -TOKOFEROLA V PRESNOVI IN
ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠČITI PRI PIŠČANCIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE ROLE OF α - AND γ -TOCOPHEROL IN CHICKEN
METABOLISM AND ANTIOXIDATIVE PROTECTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 9. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje prehrana. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Janez Salobir in za somentorja prof. dr. Simon Horvat.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Marjan SIMČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član:izr. prof. dr. Borut POLJŠAK
Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta

Datum zagovora: 16. april 2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Urška Tomažin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 636.5.084/.087(043.3)=163.6
KG	perutnina/pitovni piščanci/prehrana živali/vitamin E/tokoferoli/oksidacijski stres/meso/oksidacijska stabilnost/izražanje genov
KK	AGRIS L02/6100
AV	TOMAŽIN, Urška, univ. dipl. inž. zoot.
SA	SALOBIR, Janez (mentor)/HORVAT, Simon (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje prehrana
LI	2014
IN	VLOGA α - IN γ -TOKOFEROLA V PRESNOVI IN ANTIOKSIDACIJSKI ZAŠČITI PRI PIŠČANCIH
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 108 str., 15 pregl., 29 sl., 1 pril., 210 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vitamin E je eden najbolj učinkovitih antioksidantov, ki preprečujejo oksidacijo v maščobnem okolju. V raziskavi smo preučevali vpliv α - in γ -tokoferola ter njune kombinacije na preprečevanje lipidne oksidacije <i>in vivo</i> in v mesu. Na nivoju transkriptoma smo preučevali tudi njun vpliv na izražanje jetrnih genov. V prehranski poskus smo vključili 46 en dan starih piščancev, ki smo jih razdelili v pet skupin in krmili s krmo sestavljeno pretežno iz pšenice in sojinih tropin z dodatkom 5 % maščobe do starosti 30 dni. Za kontrolo smo uporabili dve skupini, negativna kontrola (Kont-, N=10) je prejela palmino mast, pozitivna (Kont+, N=10) laneno olje, s katerim smo inducirali oksidacijski stres. Tri skupine so prejemale laneno olje z dodatkom 67 mg/kg vitamina E, skupina α (N=10) v obliki α -tokoferola, γ (N=8) v obliki γ -tokoferola in $\alpha+\gamma$ (N=8) polovično kombinacijo obeh oblik. Za ugotavljanje prisotnosti oksidacijskega stresa smo izmerili koncentracijo malondialdehida v plazmi, jetrih in mesu, izmerili antioksidacijsko kapaciteto krvne plazme, koncentracijo tokoferolov v plazmi in različnih tkivih ter ocenili stopnjo poškodb DNA limfocitov. Razlike v izražanju genov smo ocenili z analizo mikromrež, rezultate pa potrdili s RT-qPCR. Zauživanje lanenega olja je povzročilo povečanje oksidacijskega stresa v organizmu in mesu živali, ki ga je dodatek α -tokoferola uspešno zmanjšal. V nekaterih primerih je bila učinkovita kombinacija obeh oblik, ugoden vpliv γ -tokoferola se je pokazal le pri merjenju poškodb DNA limfocitov. Tudi rezultati mikromrež so pokazali vpliv te oblike na gene, ki so povezani z imunostjo in vnetnimi procesi. Vpliv α -tokoferola na različno izražanje genov je bil opazen predvsem pri genih, ki vplivajo na presnovo maščob in holesterola ter tistih, ki so povezani z uravnavanjem oksidacijskega stresa. Vpliv različnih virov maščobe na te gene smo opazili tudi pri primerjavi kontrolnih skupin. Na podlagi rezultatov lahko potrdimo ugodno delovanje α -tokoferola in kombinacije obeh tokoferolov pri preprečevanju oksidacijskega stresa, preučevanje delovanja γ -tokoferola pa nakazuje njegov učinek pri imunskih in vnetnih procesih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 636.5.084/.087(043.3)=163.6
CX poultry/broilers/animal nutrition/vitamin E/tocopherols/oxidative stress/meat stability/gene expression
CC AGRIS L02/6100
AU TOMAŽIN, Urška
AA SALOBIR, Janez (supervisor)/HORVAT, Simon (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, field nutrition
PY 2014
TI THE ROLE OF α - AND γ -TOCOPHEROL IN CHICKEN METABOLISM AND ANTIOXIDATIVE PROTECTION
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 108 p., 15 tab., 29 fig., 1 ann., 210 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Vitamin E is one of the most powerful antioxidants, which prevents oxidation in lipid environment. Our research has focused on the effect of two vitamin E isomers - α - and γ -tocopherol in the prevention of oxidative stress *in vivo* and in meat. Using the microarray technology we examined their effect on liver transcriptome. Forty-six one-day old broilers were included in a nutritional trial and divided into five experimental groups. The animals were fed diets consisting mainly of wheat and soybean meal with the addition of 5 % fat for 30 days. The negative control (Kont-, N=10) received the diet with palm oil, while positive control (Kont+, N=10) and three other groups received the same amount of linseed oil in order to increase oxidative stress. Three groups were given 67 mg/kg of different forms of vitamin E, group α (N=10) received α -tocopherol, γ (N=8) γ -tocopherol, while $\alpha+\gamma$ (N=8) received half amounts of both tocopherols. To evaluate the presence of oxidative stress we analysed plasma, liver and muscle malondialdehyde concentration, measured the antioxidative capacity, the concentration of tocopherols in plasma and different tissues and evaluated the lymphocyte DNA damage. Differences in gene expression were measured using the microarray technology and RT-qPCR. Feeding linseed oil increased oxidative stress in the organism and in meat, but the addition of α -tocopherol was able to reduce it. In some cases the combination was also efficient in its prevention, while the effect of γ -tocopherol was seen only in the reduction of lymphocyte DNA damage. Its effect in the field of immunity and inflammatory processes was also evident analysing the microarray results, while α -tocopherol affected genes involved in lipid and cholesterol metabolism and those connected to oxidative stress regulation. Similar results were shown when comparing the control groups. On the basis of the results we can confirm the activity of α -tocopherol and the combination of both tocopherols in the reduction of oxidative stress, while the activity of γ -tocopherol is indicated in immune and inflammatory processes.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OKSIDACIJSKI STRES	4
2.2 ANTIOKSIDANTI	7
2.3 VITAMIN E	8
2.3.1 Vsebnost izomer vitamina E v živilih	10
2.3.2 Presnova vitamina E	12
2.3.3 Antioksidativno delovanje α-tokoferola	13
2.3.4 Vloga γ-tokoferola	16
2.3.5 Sinergistično delovanje α- in γ-tokoferola	19
2.3.6 Vitamin E v prehrani piščancev	20
2.4 VPLIV VITAMINA E NA TRANSKRIPCIO GENOV	21
2.4.1 Nutrigenetika in nutrigenomika	21
2.4.2 Nutrigenomika v kmetijstvu	22
2.4.3 Vpliv vitamina E na transkripcijo genov	23
3 MATERIAL IN METODE	25
3.1 PREHRANSKI POSKUS	25
3.2 DOLOČANJE POŠKODB DNA LIMFOCITOV - KOMETNI TEST	28
3.2.1 Izolacija limfocitov	28
3.2.2 Kometni test	29
3.2.3 Mikroskopska analiza	30
3.3 ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA V MAŠČOBI TOPNIH SPOJIN (ACL)	31
3.4 ANTIOKSIDATIVNA MOČ REDUKCIJE ŽELEZA (FRAP)	32
3.5 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA	32
3.6 KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA	33
3.6.1 Malondialdehid v krvni plazmi	33
3.6.2 Malondialdehid v mišicah in jetrih	34

3.7	ANALIZA VITAMINA E	34
3.7.1	Vitamin E v krvni plazmi	35
3.7.2	Vitamin E v tkivih	35
3.8	HOLESTEROL IN TRIGLICERIDI	36
3.9	ANALIZA JETRNEGA TRANSKRIPTOMA	36
3.9.1	Izolacija RNA iz jeter piščancev in analiza mikromrež	36
3.9.2	Potrditev podatkov mikromrež (RT-qPCR)	37
3.10	STATISTIČNA OBDELAVA	37
3.10.1	Statistična obdelava fenotipskih podatkov	37
3.10.2	Statistična obdelava podatkov pridobljenih z analizo mikromrež	39
4	REZULTATI	40
4.1	PROIZVODNI REZULTATI	40
4.2	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA PRSNE IN STEGENSKE MIŠICE TER JETER	41
4.3	VITAMIN E V KRVNI PLAZMI IN TKIVIH	45
4.4	PLAZEMSKI HOLESTEROL IN TRIGLICERIDI	49
4.5	POKAZATELJI OKSIDACIJSKEGA STRESA <i>in vivo</i>	50
4.5.1	Malondialdehid	50
4.5.2	Poškodbe DNA limfocitov	50
4.5.3	Antioksidativna kapaciteta krvne plazme	51
4.6	LIPIDNA OKSIDACIJA V PRSNI IN STEGENSKI MIŠICI	52
4.7	ANALIZA JETRNEGA TRANSKRIPTOMA	56
5	RAZPRAVA	64
5.1	VPLIV RAZLIČNIH VIROV MAŠČOBE TER α - IN γ -TOKOFEROLA NA OKSIDACIJSKI STRES V ORGANIZMU	64
5.2	VPLIV RAZLIČNIH VIROV MAŠČOBE TER α - IN γ -TOKOFEROLA PRI OKSIDACIJI MESA	68
5.3	VPLIV KRMLJENJA RAZLIČNIH VIROV MAŠČOB TER α -, γ -TOKOFEROLA IN NJUNE KOMBINACIJE NA TRANSKRIPCIO GENOV	70
5.3.1	Vpliv krmljenja lanenega olja v primerjavi s palmino mastjo na izražanje genov	70
5.3.1.1	Vpliv VNMK na gene, ki sodelujejo pri presnovi maščob in holesterola	70
5.3.1.2	Vpliv različnih virov maščobe na izražanje genov povezanih z oksidacijskim stresom	73
5.3.2	Vpliv izomer vitamina E na izražanje genov	74

5.3.2.1	Vpliv vitamina E na izražanje genov povezanih s presnovo maščob in holesterola	74
5.3.2.2	Vpliv vitamina E na izražanje genov, ki so povezani z oksidacijskim stresom	78
5.3.2.3	Vpliv izomer vitamina E na izražanje genov, ki so povezani z vnetnimi in imunskimi procesi	80
6	SKLEPI	82
7	POVZETEK (SUMMARY)	84
7.1	POVZETEK	84
7.2	SUMMARY	87
8	VIRI	90
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Reaktivne kisikove in reaktivne dušikove spojine ter njihove lastnosti (Lieberman in Marks, 2009)	5
Preglednica 2: Struktura tokoferolov in tokotrienolov se razlikuje glede na število in pozicijo metilnih skupin na kromanolnem obroču	9
Preglednica 3: Vsebnost vitamina E v oljih, oreščkih in žitaricah (mg/100 g) (Souci in sod., 2008)	11
Preglednica 4: Sestava krmnih mešanic ter vir dodane maščobe in vitamina E	26
Preglednica 5: Sestava premiksa	27
Preglednica 6: Kemijska analiza krmnih mešanic	28
Preglednica 7: Maščobnokislinska sestava prsne mišice (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)	42
Preglednica 8: Maščobnokislinska sestava stegenske mišice (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)	43
Preglednica 9: Maščobnokislinska sestava jeter (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)	44
Preglednica 10: Statistični parametri pri ovrednotenju vplivov na koncentracijo vitamina E v plazmi in tkivih	48
Preglednica 11: Statistični parametri pri ovrednotenju vplivov na koncentracijo malondialdehida v prsni in stegenski mišici shranjenih na različne načine	55
Preglednica 12: Razlike v izražanju genov med skupinama Kont+ in Kont-	60
Preglednica 13: Razlike v izražanju genov med skupinama α in Kont+	61
Preglednica 14: Razlike v izražanju genov med skupinama γ in Kont+	62
Preglednica 15: Razlike v izražanju genov med skupinama $\alpha+\gamma$ in Kont+	63

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Nastanek celičnih poškodb zaradi delovanja prostih radikalov (prirejeno po Lieberman in Marks, 2009)	6
Slika 2: Shematski prikaz mehanizmov celične obrambe proti poškodbam celic, ki jih povzroča oksidacijski stres (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007)	8
Slika 3: Osnovni strukturi tokoferola in tokotrienola	9
Slika 4: Presnova vitamina E (prirejeno po Wagner in sod., 2004)	13
Slika 5: Inicijacija in vzpostavitev verižne reakcije pri oksidaciji maščobnih kislin (MK)	15
Slika 6: Zaustavitev verižne reakcije zaradi delovanja α -tokoferola in regeneracija α -tokoferola	16
Slika 7: Primer uporabe orodij nutrigenomike v prehranski industriji z namenom povečevanja ekonomskih koristi in izboljševanja prehrane in zdravja ljudi (Brown in van der Ouderaa, 2007)	23
Slika 8: Izolacija limfocitov iz piščančje krvi	29
Slika 9: Primer jedrne DNA limfocita, vidne pri mikroskopski analizi kometnega testa	31
Slika 10: Zauživanje krme pri piščancih po poskusnih skupinah	40
Slika 11: Prirast pri piščancih po poskusnih skupinah	40
Slika 12: Konverzija krme pri piščancih po poskusnih skupinah	41
Slika 13: Koncentracija α -tokoferola v krvni plazmi in tkivih med poskusnimi skupinami	45
Slika 14: Koncentracija α -tokoferola v krvni plazmi in tkivih znotraj posamezne poskusne skupine	46
Slika 15: Koncentracija γ -tokoferola med poskusnimi skupinami v krvni plazmi in tkivih	47
Slika 16: Koncentracija γ -tokoferola v krvni plazmi in tkivih znotraj posamezne poskusne skupine	48
Slika 17: Koncentracija skupnega holesterola in trigliceridov v plazmi	49
Slika 18: Koncentracija malondialdehida (MDA) v jetrih in krvni plazmi	50
Slika 19: Poškodbe DNA limfocitov, predstavljene kot delež DNA v repu kometa in OTM	51
Slika 20: Antioksidativna kapaciteta krvne plazme merjena kot FRAP in ACL	51
Slika 21: Koncentracija malondialdehida (MDA) v prsni mišici shranjeni na različne načine – razlike med skupinami	52
Slika 22: Koncentracija malondialdehida (MDA) v prsni mišici shranjeni na različne načine – razlike po pogojih shranjevanja	53

Slika 23:	Koncentracija malondialdehida (MDA) v stegenski mišici shranjeni na različne načine – razlike med skupinami	54
Slika 24:	Koncentracija malondialdehida (MDA) v stegenski mišici shranjeni na različne načine – razlike po pogojih shranjevanja	55
Slika 25:	Vennov diagram, ki prikazuje različno izražene gene med poskusnimi skupinami	56
Slika 26:	Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v presnovo maščob v primerjavi s Kont+	57
Slika 27:	Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v presnovo holesterola v primerjavi s Kont+	58
Slika 28:	Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v regulacijo oksidacijskega stresa v primerjavi s Kont+	59
Slika 29:	Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, povezane z vnetnimi procesi in imunostjo v primerjavi s Kont+	59

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih pri RT-qPCR

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACACA	acetil CoA-karboksilaza alfa (<i>angl.</i> acetyl CoA carboxylase alpha)
ACL	antioksidativna kapaciteta v maščobah topnih spojin (<i>angl.</i> antioxidative capacity of the lipid soluble compounds)
ADIPOQ	adiponektin (<i>angl.</i> adiponectin)
ANGPTL3	angiopoietin 3 (<i>angl.</i> angiopoietin-like 3)
ATF4	aktivirajoči transkripcijski faktor 4 (<i>angl.</i> activating transcription factor 4)
BHT	butilirani hidroksi toluen
CD36	odstranjevalni receptor CD36 (<i>angl.</i> scavenger receptor CD36)
CEHC	karboksi-etil-hidroksi-kroman (<i>angl.</i> carboxy-ethyl-hydroxy-chroman)
CETP	protein za prenos holesterolnih estrov (<i>angl.</i> cholesteryl ester transfer protein)
CoQ	koencim Q10 (<i>angl.</i> coenzyme Q10)
COQ10B	koencim Q10 homolog B (<i>angl.</i> coenzyme Q10 homolog B)
CPT1A	karnitin palmitoil transferaza 1 α (<i>angl.</i> carnitine palmitoyltransferase 1 alpha)
CYP	citokrom P450 (<i>angl.</i> cytochrome P450)
CYP2C45	citokrom P-450 2C45 (<i>angl.</i> cytochrome P-450 2C45)
DEPC	dietilpirokarbonat
DHA	dokozaheksaenojska kislina
DHCR7	7-dehidroholesterol reduktaza (<i>angl.</i> 7-dehydrocholesterol reductase)
DIO2	deiodinaza tip II (<i>angl.</i> deiodinase type II)
DIO3	deiodinaza tip III (<i>angl.</i> deiodinase type III)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DUSP16	»dual specificity« fosfataza 16 (<i>angl.</i> dual specificity phosphatase 16)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
EPA	eikozapentaenojska kislina
FASN	sintaza maščobnih kislin, (<i>angl.</i> fatty acid synthase)
FDFT1	farnezil difosfat farneziltransferaza, <i>sin.</i> skvalen sintaza (<i>angl.</i> farnesyl diphosphate farnesyltransferase 1)
FDPS	farnezil difosfat sintaza (<i>angl.</i> farnesyl diphosphate synthase)
FRAP	antioksidativna moč redukcije železa (<i>angl.</i> ferric reducing capacity)
FST	folistatin (<i>angl.</i> follistatin)
GALE	UDP-galaktoza-4-epimeraza (<i>angl.</i> UDP-galactose-4-epimerase)
GCS	γ glutamilcistein sintetaza (<i>angl.</i> γ -glutamylcysteine synthetase, <i>sin.</i> glutamate cysteine ligase)
GSH	glutation

<i>GSTA</i>	glutathion S-transferaza alfa (<i>angl.</i> glutathione S-transferase alpha)
<i>GSTM</i>	glutathion S-transferaza mu (<i>angl.</i> glutathione S-transferase mu)
<i>GSTO</i>	glutathion S-transferaza omega (<i>angl.</i> glutathione S-transferase omega)
HDL	lipoprotein visoke gostote
<i>HMGCL</i>	3-hidroksimetil-3-metilglutaril-CoA liaza (<i>angl.</i> 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase)
<i>HMGCR</i>	3-hidroksimetil-3-metilglutaril-CoA reduktaza (<i>angl.</i> 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)
<i>HMOX1</i>	hem oksigenaza 1 (<i>angl.</i> heme oxygenase 1)
<i>HNF4α</i>	hepatocitni jedrni faktor 4 alfa (<i>angl.</i> hepatocyte nuclear factor 4 alpha)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
<i>ICER</i>	represorski produkt gena <i>CREM</i> (<i>angl.</i> inducible cAMP early repressor)
<i>ID1I</i>	izopentenil-difosfat delta izomeraza 1 (<i>angl.</i> isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1)
IFN	interferon
IL	interlevkin (<i>angl.</i> interleukin)
<i>INHBA</i>	inhibin beta A (<i>angl.</i> inhibin beta A)
<i>IRF</i>	interferon regulatorni faktor (<i>angl.</i> interferon regulatory factor)
IU	internacionalna enota
JNK	<i>angl.</i> c Jun N-terminal kinase
LDL	lipoprotein nizke gostote
LMP	znižana temperatura tališča
<i>LPIN1</i>	lipin 1 (<i>angl.</i> lipin 1)
LPS	lipopolisaharid
LSS	lanosterol sintaza (<i>angl.</i> lanosterol synthase)
<i>LXR</i>	jetrni X receptor (<i>angl.</i> liver X receptor)
<i>LY96</i>	limfocitni antigen 96 (<i>angl.</i> lymphocyte antigen 96)
MAPK	z mitogenom aktivirana protein kinaza (<i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase)
MDA	malondialdehid
MQ	voda mili Q
NF- κ B	jedrni faktor κ -B (<i>angl.</i> nuclear factor κ -B)
<i>NFE2L2</i>	jedrni faktor »erythroid 2-related factor« (<i>angl.</i> nuclear factor erythroid 2-related factor)
NMK	nasičene maščobne kisline
NMP	normalna temperatura tališča
NOS	sintaza dušikovega oksida (<i>angl.</i> nitric oxide synthase)
<i>NSDHL</i>	od NAD(P) odvisna steroidna dehidrogenaza (<i>angl.</i> NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like)
OTM	repni moment po Olivu (<i>angl.</i> Olive tail moment)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (<i>angl.</i> phosphate buffer saline)

<i>PCK1</i>	fosfoenolpiruvat karboksikinaza 1 (<i>angl.</i> phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)
<i>PCR</i>	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
<i>PDK4</i>	piruvat dehidrogenaza kinaza, izocim 4 (<i>angl.</i> pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4)
<i>PIK3R1</i>	fosfoinozimid-3-kinaza, podenota 1(alfa) (<i>angl.</i> phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha))
<i>PPAR</i>	receptor, aktiviran s peroksisomskim proliferatorjem (<i>angl.</i> peroxisome proliferator-activated receptor)
<i>PPARGCIA</i>	receptor, aktiviran s peroksisomskim proliferatorjem γ , koaktivator 1 α (<i>angl.</i> peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1)
<i>RNA</i>	ribonukleinska kislina
<i>RSFR</i>	levkocitna ribonukleaza A-2 (<i>angl.</i> leucocyte ribonuclease A-2)
<i>SCP2</i>	<i>angl.</i> sterol carrier protein 2
<i>SIRT1</i>	sirtuin 1 (<i>angl.</i> sirtuin 1)
<i>SQLE</i>	skvalen epoksidaza (<i>angl.</i> squalen epoxidase)
<i>SREBF</i>	od sterolov-odvisni DNA-regulatorni element vezavni protein (<i>angl.</i> sterol regulatory element-binding protein)
<i>TBA</i>	tiobarbiturna kislina
<i>TCA</i>	trikloroacetna kislina
<i>TLR</i>	Tollu podobni receptor (<i>angl.</i> Toll-like recetor)
<i>TNF</i>	tumorje-nekrotizirajoči faktor (<i>angl.</i> tumor necrosis factor)
α -TTP	α -tokoferol prenašalni protein
<i>VLDL</i>	lipoprotein zelo nizke gostote
<i>VNMG</i>	večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

Antioksidanti so snovi, ki imajo sposobnost preprečevanja ali zaviranja nezaželenih oksidativnih sprememb na nekem substratu, že če so v primerjavi s substratom prisotne v majhnih količinah. Preprečujejo in zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije in s tem zavirajo oksidacijske verižne reakcije, ne da bi se pri tem sami vključili vanje (Halliwell in Gutteridge, 2000). S tem preprečujejo oksidacijo biološko pomembnih molekul v organizmu, ki so tarče prostih radikalov. Funkcija antioksidantov pa ni le varovanje bioloških molekul pred prostimi radikali, delujejo lahko tudi kot signalne molekule in vplivajo na pomembne korake, ki so vpleteni v izražanje genov. S spreminjanjem aktivnosti transkripcijskih faktorjev lahko opazno spremenijo mRNA in koncentracije proteinov (Frank in sod., 2006).

Eden najbolj učinkovitih v maščobi topnih antioksidantov je vitamin E. V naravi poznamo osem različnih oblik tega vitamina: α -, β -, γ - in δ - tokoferole in tokotrienole (Machlin, 1991). Vitamin E zaradi svojega antioksidativnega delovanja ohranja maščobe v bioloških sistemih kot tudi v hrani v stabilni obliki (Wagner in sod., 2004). Tokoferoli in tokotrienoli namreč zelo hitro reagirajo s prostimi radikali in jih odstranijo, še preden ti reagirajo z maščobnimi kislinami ali membranskimi proteini, in so zaradi tega najpomembnejši inhibitorji verižnih reakcij lipidne peroksidacije (Halliwell in Gutteridge, 2000). Dolgo časa se je pozornost raziskovalcev usmerjala predvsem na α -tokoferol, v zadnjem času pa so se začele tudi raziskave, ki naj bi pokazale kakšno vlogo imajo ostale oblike tokoferolov pri preprečevanju nastanka degenerativnih bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, rak, nevrodegenerativne bolezni, starostno pogojena katarakta. Pozornost se posveča predvsem γ -tokoferolu, saj naj bi ta oblika vitamina E imela komplementarne učinke k delovanju α -tokoferola (Wagner in sod., 2004). Čeprav ima γ -tokoferol zaradi odsotnosti metilne skupine na C-5 atomu na kromanolnem obroču slabše antioksidativne sposobnosti kot α -tokoferol, mu prav odsotnost te metilne skupine omogoča vezavo lipofilnih reaktivnih dušikovih spojin. Zato veliko boljše kot α -tokoferol odstranjuje dušikov oksid in v tem pogledu dopolnjuje njegovo delovanje (Cooney in sod., 1995; Christen in sod., 1997).

Zaradi zahtev potrošnikov in zdravstvenih strokovnjakov, ki zagovarjajo dodajanje antioksidantov naravnega izvora v hrano, se vitamin E velikokrat dodaja v krmo živalim (Botsoglou in sod., 2010), saj je pomemben tudi zaradi preprečevanja kvarjenja proizvodov, ki so zaradi večje vsebnosti večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) podvrženi lipidni oksidaciji. Kot dodatek v krmo se uporablja α -tokoferol, ki ima največjo biološko vrednost med vsemi oblikami vitamina E (Meydani, 1995). Ker je γ -tokoferol oblika vitamina E, ki je najbolj zastopana v hrani in krmi, nas zanima, kako dodajanje te oblike ter dodatek kombinacije α - in γ -tokoferola vpliva na organizem živali in na oksidacijsko stabilnost njihovega mesa. V krmi piščancev, ki jih redimo z

namenom prireje mesa (predvsem v koruzi in soji), se nahaja veliko γ -tokoferola. Ob ugodnem delovanju te oblike bi bilo mogoče ob upoštevanju γ -tokoferola, ki se nahaja v krmi, zmanjšati količino dodanega α -tokoferola.

Genetika se je v perutninarstvo začela vključevati že v 50-ih letih prejšnjega stoletja, saj se je takrat pričela selekcija živali, namenjenih za prirejo jajc oziroma za prirejo mesa. Končni rezultat intenzivne selekcije znotraj linije so živali z zelo podobnimi lastnostmi, ki so si genetsko med seboj zelo podobne (Muir in sod., 2008). V nasprotju z genomiko, ki preučuje delovanje celotnega genoma in interakcije med posameznimi geni, se nutrigenomika ukvarja z vprašanji, kako posamezna hranila vplivajo na izražanje genov (Kaput in sod., 2005). Eden izmed pomembnih ciljev nutrigenomskih raziskav je razvijanje krme, ki bi bila prilagojena genotipu posamezne živali (Ghormade in sod., 2011). Glede na strogo selekcijo znotraj linij pri perutninarstvu in genetsko podobnost živali znotraj linij, so tovrstne raziskave še toliko bolj zanimive. Ker vitamin E vpliva na celični odziv na oksidacijski stres s spreminjanjem signalnih transdukcijskih poti (Bramley in sod., 2000), so vse bolj pogoste raziskave, ki preučujejo njegov vpliv na ravni genoma. Novejše raziskave, ki so preučevale biološke funkcije vitamina E, so namreč pokazale, da vitamin E ni le pomemben antioksidant, temveč tudi transkripcijski regulator izražanja genov (Barella in sod., 2004). Preko spreminjanja specifičnih signalnih poti in genov, ki sodelujejo pri proliferacijskih, presnovnih, vnetnih in antioksidativnih poteh ima vlogo pri vzdrževanju celične homeostaze (Galli in Azzi, 2010).

Namen raziskave je doprinos k poznavanju delovanja α - in γ -tokoferola ter njune kombinacije pri piščancih v pogojih s pomočjo VNMK inducirane oksidacijskega stresa *in vivo* ter v svežem ter skladiščnem mesu. S pomočjo različnih metod smo želeli preučiti, kakšno je antioksidativno delovanje posameznih oblik in njune kombinacije v pogojih, ko je oksidacijski stres induciran s pomočjo lanenega olja. Delovanje γ -tokoferola pri piščancih v takih pogojih še ni bilo preučevano, prav tako ne kombinacija α - in γ -tokoferola. S pomočjo nutrigenomskih raziskav smo dobili tudi vpogled v delovanje omenjenih oblik na nivoju transkriptoma pri piščancih. S tem smo pridobili nova znanja o tem, kateri geni in presnovne poti so vpleteni v indukcijo oksidacijskega stresa, povzročene z n-3 VNMK, ter katere presnovne poti so povezane z delovanjem različnih oblik tokoferolov.

V raziskavi smo preverili naslednje hipoteze:

- Dodatek n-3 VNMK spremeni maščobnokislinsko sestavo mesa, poveča oksidacijski stres in zmanjša oksidativno stabilnost mesa.
- Dodatek različnih oblik vitamina E (α -, γ -tokoferol, kombinacija obeh) različno vpliva na zmanjšanje lipidne oksidacije, ki je posledica povečanega zauživanja n-3

VNMK ter različno vpliva na antioksidativno kapaciteto organizma in antioksidativno stabilnost mesa.

- Nalaganje vitamina E v različna tkiva se pri dodajanju različnih oblik vitamina E razlikuje.
- Oksidacijski stres ter α - in γ -tokoferol različno vplivajo na transkriptom piščancev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJSKI STRES

O oksidacijskem stresu govorimo takrat, kadar se v organizmu poruši ravnovesje med prostimi radikali in antioksidativno obrambo (Halliwell, 2007), oziroma kadar pride do motenj v ravnovesju med prooksidanti in antioksidanti v prid prooksidantom (Sies, 1991, cit. po Sies, 1997). Oksidativne poškodbe so posledica tega neravnovesja in se kažejo v spremembah celičnih makromolekul, celični smrti, ki je posledica apoptoze ali nekroze ali v strukturnih poškodbah tkiv (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Prikaz poškodb celice zaradi delovanja prostih radikalov je predstavljen na sliki 1.

Prosti radikali so glavni povzročitelji oksidacijskega stresa. To so atomi, molekule in ioni, ki so sposobni samostojnega obstanka in imajo vsaj en elektron brez para (Halliwell in Gutteridge, 2000). Na organizem imajo lahko pozitivne učinke, sicer pa se večina njihovega delovanja smatra za škodljivo. Nekateri prosti radikali so močno reaktivni in lahko poškodujejo beljakovine, nukleinske kisline, fosfolipide in ostale celične makromolekule. Zaradi tega je onemogočeno normalno delovanje celic (Bramley in sod., 2000). Prosti radikali v organizmu nastajajo v različnih reakcijah, na primer v respiratorni verigi v mitohondrijih pri pretvorbi kisika v vodo. Veliko prostih radikalov se proizvede v imunskih reakcijah, predvsem v avtoimunskem odgovoru organizma na okužbe. K nastanku prostih radikalov pripomorejo tudi zunanji vplivi: ionizacijska in neionizacijska sevanja, onesnaženost zraka, strupeni plini (ozon), kemikalije in toksini (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). V *in vitro* reakcijah je dokazano tudi, da prosti radikali nastajajo pri oksidaciji kovin – pri Fentonovi reakciji. V *in vivo* pogojih je zaradi omejene količine prostih kovin v organizmu nastanek prostih radikalov manjši (Chen in sod., 2000). Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so superoksidni anion (O_2^-), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal (OH \cdot), vodikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida (NO \cdot) in peroksilni radikal (ROO \cdot) (Korošec, 2000). Najpomembnejše kisikove in dušikove spojine, ki so vpletene v nastanek oksidacijskega stresa, so predstavljene v preglednici 1.

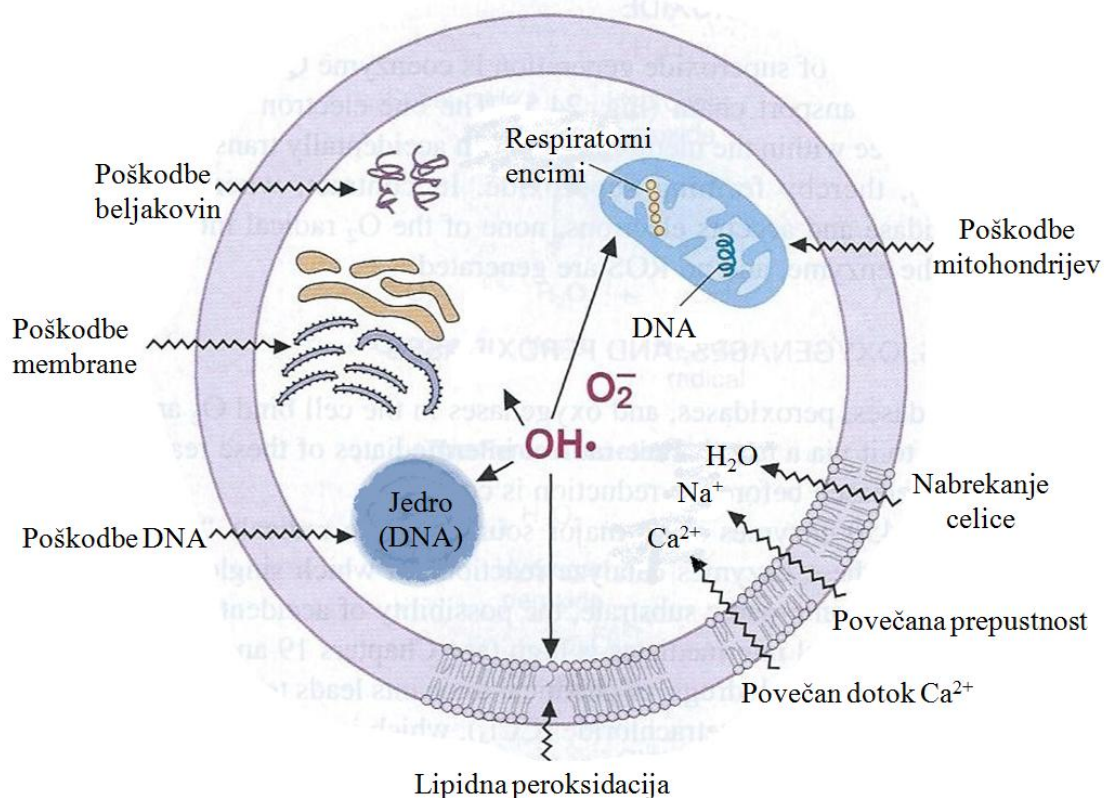
Čeprav proste radikale obravnavamo predvsem s stališča njihovih škodljivih učinkov na organizem, imajo tudi lastnosti, ki so za organizem nujno potrebne. So namreč endogene signalne molekule, vključene v kontrolo poglavitnih kaskadnih reakcij, kot sta apoptoza in vnetje. Povečana produkcija prostih radikalov tako ni nujno povezana z oksidativnimi poškodbami. Primer je radikal NO \cdot , ki ga imunske celice proizvajajo kot obrambo proti infekcijam. Vendar kljub temu, da povečana produkcija NO \cdot ni nujno povezana z oksidacijskim stresom, lahko prisotnost tega radikala vodi v nastanek drugega oksidanta - peroksinitrita (ONOO \cdot), ki ima škodljive učinke (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Preglednica 1: Reaktivne kisikove in reaktivne dušikove spojine ter njihove lastnosti (Lieberman in Marks, 2009)

Table 1: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species and their characteristics (Lieberman and Marks, 2009)

Reaktivna spojina		Lastnosti
O_2^-	superoksidni anion	Nastaja v elektronski prenašalni verigi in drugih mestih. Povzroča nastanek drugih kisikovih reaktivnih spojin.
H_2O_2	vodikov peroksid	Ni prosti radikal, vendar generira nastanek prostih radikalov, zanj je značilno prehajanje v in preko celičnih membran.
OH^\cdot	hidroksilni radikal	Najbolj reaktivna vrsta kisikovih prostih radikalov. Nastanek povzroča H_2O_2 v Fentonovi reakciji ob prisotnosti Fe^{2+} ali Cu^+ .
RO^\cdot , R^\cdot ; R-S	organski radikali	Organski prosti radikali (R predstavlja preostanek spojine). Nastajajo iz ROH, RH (npr. na ogljikovem atomu dvojne vezi maščobne kisline) ali RSH pri napadu OH^\cdot .
$RCOO^\cdot$	peroksilni radikal	Organski peroksilni radikal, nastaja npr. pri degradaciji maščob (tudi LOO^\cdot).
$HOCl$	hipoklorna kislina	Nastaja v nevtrofilcih z namenom uničenja mikroorganizmov. Toksičnost substance poteka preko halogenacije in oksidacije. Spojina s toksičnimi učinki je OCl^- .
$O_2^{1\uparrow}$	singletni kisik	Kisikova spojina z antiparalelnima spinoma. Nastaja ob visokih koncentracijah kisika pod vplivom UV svetlobe.
NO	dušikov oksid	Reaktivna dušikova spojina, endogeni prosti radikal, ki nastaja ob delovanju sintaze dušikovega oksida. Pri reakciji s kisikovimi radikali generira nastanek drugih reaktivnih dušikovih spojin.
$ONOO^-$	peroksinitrit	Spojina z močno oksidacijsko sposobnostjo, ki sama po sebi ni prosti radikal, vendar povzroča nastanek radikala NO_2 .

Z reakcijami prostih radikalov povezujejo razvoj bolezni kot so sladkorna bolezen, Alzheimerjeva bolezen in druge nevrodegenerativne bolezni, ateroskleroza, ki vodi v nastanek srčno-žilnih bolezni ter nekatere vrste raka. Zato je odkrivanje delovanja mehanizmov prostih radikalov, ki vodijo v nastanek srčno-žilnih bolezni in raka predmet številnih raziskav. Razumevanje nastanka bolezni je namreč ključno za odkrivanje antioksidantov, s katerimi lahko preprečimo nastanek teh bolezni in za njihovo zdravljenje (Seifried in sod., 2007).



Slika 1: Nastanek celičnih poškodb zaradi delovanja prostih radikalov (prirejeno po Lieberman in Marks, 2009)

Figure 1: The generation of cell damage due to the activity of free radicals (adapted from Lieberman and Marks, 2009)

Merjenje oksidativnega stresa v organizmu ni najbolj preprosto. Reaktivne kisikove spojine so zelo raznolike in spremenljive, zato jih težko zaznamo. Različne metode se lahko nanašajo neposredno na določanje posameznih reaktivnih kisikovih vrst ali pa posredno na merjenje različnih produktov oksidacije. Na voljo je kar nekaj metod, vsaka ima seveda svoje prednosti in slabosti. Pogoste metode za določanje prooksidantnega statusa so: ESR (elektronska spinska resonanca), d-ROMs test, TBAR test (določanje presnovkov tiobarbiturne kisline kot produktov lipidne peroksidacije), določanje vsebnosti lipoperoksidov, določanje nekaterih stranskih produktov oksidacije (npr. izoprostanov) in kemiluminescenca (pospešena z luminolom), ki je uveljavljena pri merjenju sproščanja radikalov iz nevtrofilcev, ter določanje 8-hidroksi-deoksi-gvanozina kot kazalnika oksidacije DNA v urinu (Chance in Gao, 1994). V krvi določamo encime, ki so vključeni v zaščito celic: superoksid dismutazo, katalazo, od selena odvisne glutation peroksidaze, izoencime glutation-S-transferaze in glutation reduktazo. Poleg specifičnih parametrov lahko določimo tudi celokupni antioksidantni status (TAS) (Osredkar, 2012). Kadar merimo prisotnost oksidacijskega stresa v organizmu z indirektnimi pokazatelji, lahko glede na rezultate nekaterih metod

sklepamo na prisotnost oksidacijskega stresa, glede na rezultate drugih metod tega ne moremo dokazati. Zato bi bilo potrebno primerjati in standardizirati metode, s katerimi oksidacijski stres merimo. S tem bi pridobili univerzalno skalo pokazateljev oksidacijskega stresa in omogočili izdelavo specifičnih tabel z »normalnimi vrednostmi« pri določeni starosti in spolu. Dokler se tak sistem ne vzpostavi, je prisotnost oksidacijskega stresa v organizmu najbolje ocenjevati s primerjanjem rezultatov različnih metod (Poljšak in sod., 2013).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki imajo sposobnost, da že v majhnih količinah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih, sem sodijo tako živi organizmi kot tudi hrana (Salobir, 2000). Preprečujejo in zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije in s tem zavirajo oksidacijske verižne reakcije, ne da bi se pri tem sami vključili vanje. S tem preprečujejo oksidacijo biološko pomembnih molekul v organizmu (lipidi, beljakovine, nukleinske kisline), ki so tarče prostih radikalov (Frankič in Salobir, 2007).

Antioksidacijski status organizma je odvisen od stanja endogenega oksidacijskega sistema in od eksogenih oksidantov, ki jih zaužijemo s hrano (Salobir, 2000). Antioksidacijsko obrambo organizma lahko razdelimo na tri nivoje:

- primarno,
- sekundarno in
- terciarno.

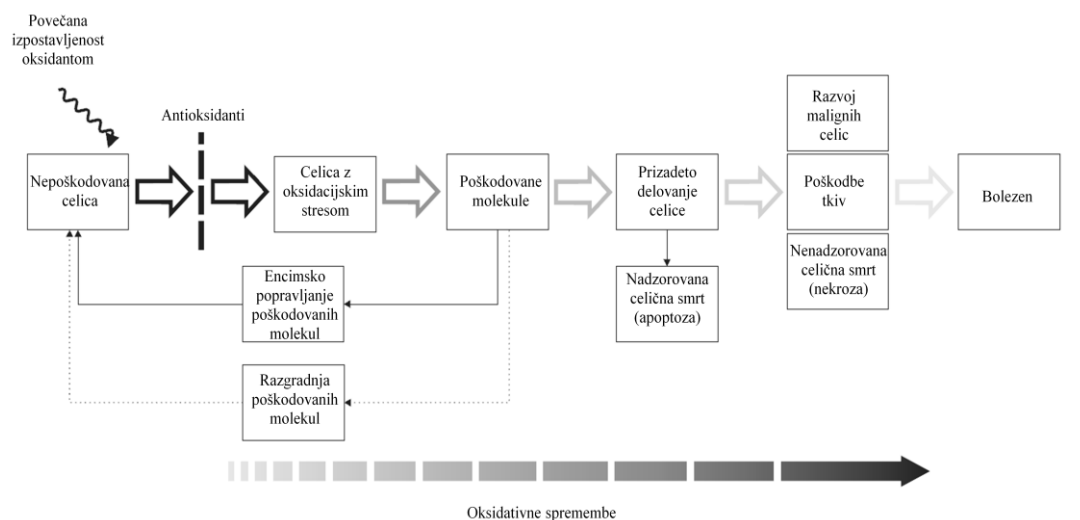
Primarno znotrajcelično antioksidacijsko obrambo predstavljajo endogeni antioksidanti, ki reaktivne radikale pretvorijo v bolj stabilne produkte in tako prekinejo verižno oksidacijsko reakcijo. Sem sodijo sledeči encimi (Fang in sod., 2002):

- mitohondrijska superoksidna dismutaza (MnSOD),
- citoplazemska superoksidna dismutaza (Cu(Zn)SOD),
- Fe-katalaza in
- glutation peroksidaza in reduktaza (GSH-Px/ GSH-R).

V sekundarno obrambo celice sodijo eksogeni antioksidanti, ki preprečujejo in zadržujejo vstop prostih radikalov v verižne reakcije, ne da bi se pri tem sami vključili vanje. Lovijo proste radikale in jih pretvarjajo v manj reaktivne spojine. Pri teh reakcijah se oksidirajo in sami postanejo radikali, vendar zaradi energetsko stabilnega neparne elektrona niso reaktivni. Nastale radikale lahko drugi antioksidanti reducirajo nazaj v osnovno obliko. Nahajajo se v plazmi, celicah in celičnih membranah. Med eksogene antioksidante sodijo vitamin C, vitamin E, polifenoli, β -karoten, glutation. Skupaj s še nekaterimi endogenimi antioksidanti (sečna in lipoična kislina, CoQ)

povečujejo učinek endogenih encimov (Fang in sod., 2002). Vitamini A, C in E delujejo neposredno na proste radikale, hkrati pa sodelujejo med seboj in omogočajo ponovno redukcijo vitaminov. Ko askorbinska kislina na primer prejme elektron od tokoferilnega radikala, se ta reducira. Dehidroaskorbinska kislina, ki pri tem nastane, se nato reducira s pomočjo glutationa (Maritim in sod., 2003).

Terciarna obramba v primeru nastalih celičnih poškodb zaradi prostih radikalov aktivira encime, ki odstranijo ali popravijo poškodovane dele molekul (lipaze, proteaze, DNA popravljalne encime) (Marnett, 2002).

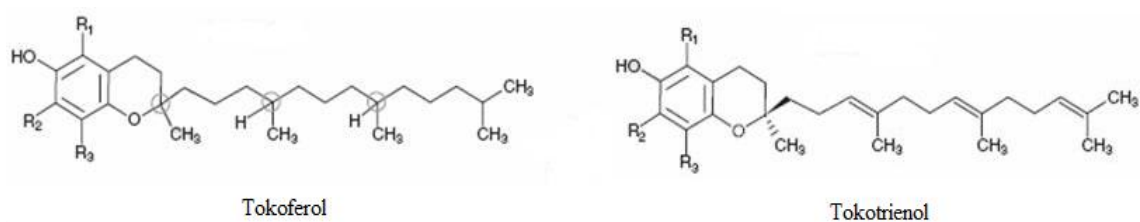


Slika 2: Shematski prikaz mehanizmov celične obrambe proti poškodbam celic, ki jih povzročajo oksidacijski stres (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007)

Figure 2: Schematic outline of cellular defences against oxidative stress-mediated cellular damage (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007)

2.3 VITAMIN E

Vitamin E je skupno ime za osem kemijsko med seboj podobnih spojin, vsi so metilni derivati tokola. Med seboj se razlikujejo po položaju in številu metilnih skupin na benzenovem obroču (Rudan-Tasič, 2000). Vsaka od osmih spojin je sestavljena iz kromanolnega obroča in fitilne stranske verige iz 16 ogljikovih atomov. V grobem jih lahko ločimo v dva razreda. V prvem so tokoferoli, ki imajo v stranski verige same nasičene vezi, v drugem pa tokotrienoli. Ti imajo v stranski verigi tri nenasičene vezi in sicer na pozicijah 3', 7' in 11'. V vsak razred sodijo štiri vitamere, ki se razlikujejo po številu in lokaciji metilnih skupin na kromanolnem obroču. Tako ločimo med α -, β -, γ - in δ - tokoferoli in α -, β -, γ - in δ - tokotrienoli (Pregl. 2).



Slika 3: Osnovni strukturi tokoferola in tokotrienola
 Figure 3: Basic tocopherol and tocotrienol structures

Ker imajo tokoferoli tri asimetrične ogljikove atome, je možnih osem različnih optičnih stereoizomer za vsako obliko. Asimetrični ogljikovi atomi se nahajajo na mestu 2' na kromanolnem obroču ter na pozicijah 4' in 8' v stranski verigi. Vse oblike, ki so prisotne v naravi, so RRR stereoizomere (Machlin, 1991). RRR- α -tokoferol ima med vsemi oblikami tokoferolov največjo biološko aktivnost in je hkrati oblika, ki je najpogosteje prisotna v hrani. Ostale izomere (β -, γ -, δ -) so prav tako prisotne v hrani, vendar je njihova biološka aktivnost manjša (Meydani, 1995) in znaša relativno z aktivnostjo RRR- α -tokoferola, ki predstavlja ekvivalent, za RRR- β -tokoferol 0,5, za RRR- γ -tokoferol 0,1 in za RRR- δ -tokoferol 0,03 (Ingold in sod., 1990, cit. po Bramley in sod., 2000).

Preglednica 2: Struktura tokoferolov in tokotrienolov se razlikuje glede na število in pozicijo metilnih skupin na kromanolnem obroču

Table 2: The structure of tocopherols and tocopherols differs in the number and the position of methyl groups on the chromanol ring

Oblika	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Najpogosteje uporabljana oblika, ki se uporablja kot prehranski dodatek, je α -tokoferol v obliki acetat estrov. Sintetične oblike vitamina E po navadi vsebujejo enake deleže vseh osmih stereoizomer α -tokoferola, vendar je aktivnost teh oblik različna. Prednost zaestrene oblike je predvsem v njegovi obstojnosti, sicer pa je antioksidativna aktivnost te oblike manjša kot aktivnost prostega tokoferola. Poznamo tudi α -tokoferol v obliki sukcinata, vendar se redkeje uporablja. V črevesju se mora acetat ester najprej deesterificirati, pri tem se sprosti aktivna oblika α -tokoferola, ki se absorbira (Drevon, 1991). All-rac- α -tokoferol, ki se pogosto uporablja, vsebuje približno 12,5 % RRR- α -tokoferola, skupaj z enakimi deleži ostalih sedmih stereoizomer, ki imajo manjšo aktivnost (Halliwell in Gutteridge, 2000). Ena IU vitamina E predstavlja ekvivalent 1 mg all-rac- α -tokoferol acetata. Aktivnost RRR- α -tokoferola je večja, saj aktivnost 1 mg RRR- α -tokoferola znaša 1,49 IU (Machlin, 1991).

2.3.1 Vsebnost izomer vitamina E v živilih

Kot povzeto v preglednem članku Wagnerja in sod. (2004), se največ vitamina E nahaja v semenih, oreščkih, živalskih izdelkih in v zelenjavi. Največji vir vitamina predstavljajo rastlinska olja, žitarice in zelenjava. Zauživanje posameznih izomer vitamina E se glede na geografsko lego razlikuje, predvsem zaradi uporabe različnih olj, ki se na določenem področju uporabljajo. Tako v Združenih državah Amerike (ZDA) zaradi večjega zauživanja sojinega in koruznega olja ljudje zaužijejo dva do štirikrat večje količine γ -tokoferola kot v evropskih državah (Saldeen K. in Saldeen T., 2005).

Kot predstavljeno v preglednici 3, se največ vitamina E nahaja v rastlinskih oljih. Največji vir α -tokoferola je olje pšeničnih kalčkov, veliko te izomere je tudi v sončničnem olju. Največ γ -tokoferola se nahaja v koruznem, sojinem, repičnem in lanenem olju. Dober vir te izomere predstavljajo tudi semena rastlin, iz katerih ta olja pridobivajo. V hrani živalskega izvora se nahaja predvsem α -tokoferol in sicer v maščobnem tkivu, v primerjavi z rastlinskimi olji pa maščobe živalskega izvora vsebujejo manjše količine tega vitamina (Gropper in sod., 2009).

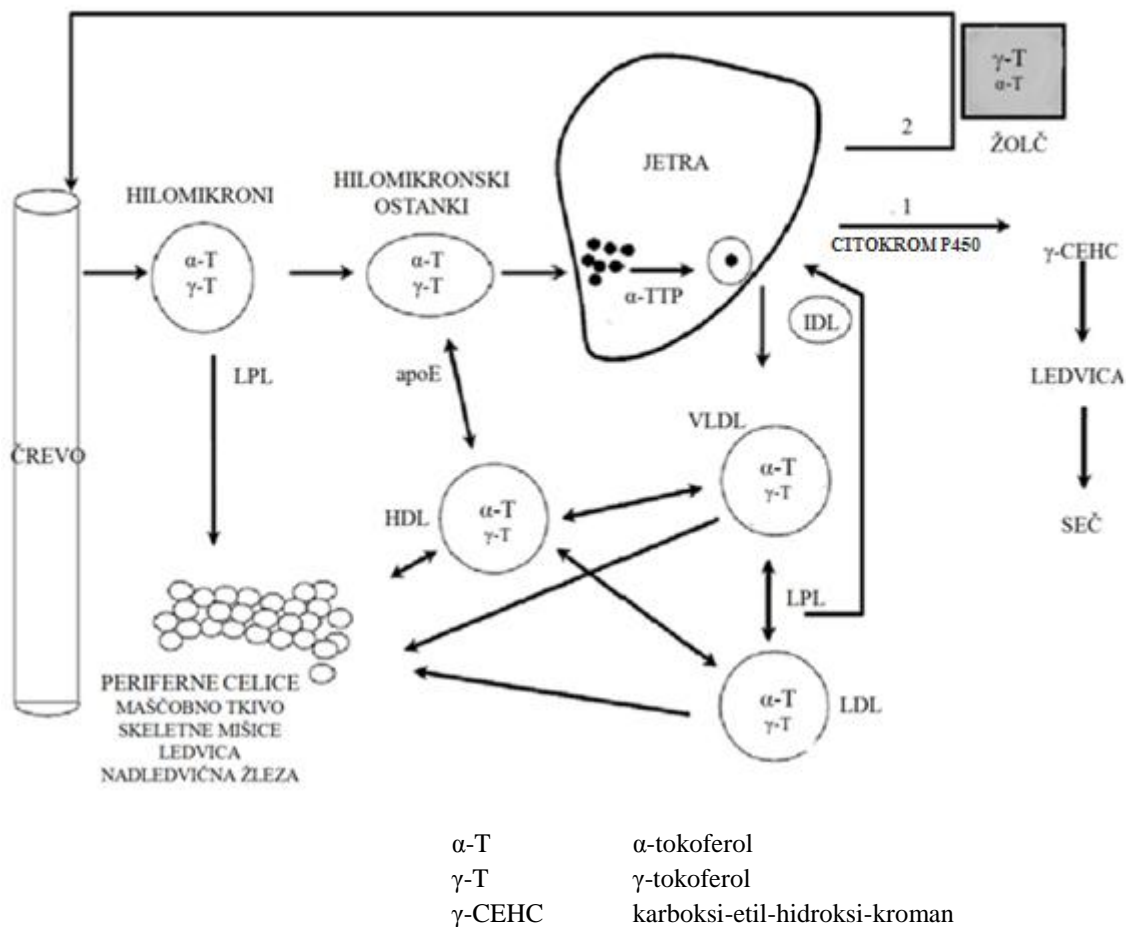
Preglednica 3: Vsebnost vitamina E v oljih, oreščkih in žitaricah (mg/100 g) (Souci in sod., 2008)
Table 3: Vitamin E content in oils, nuts and cereals (mg/100 g) (Souci et al., 2008)

Živilo	α - tokoferol	β - tokoferol	γ - tokoferol	δ - tokoferol	α -toko- trienol	β -toko- trienol	γ -toko- trienol
Maslo	2						
Loj	1,3						
Svinjska mast	1,6	0,09					
Arašidovo olje	8,9	0,38	4,8	0,97			
Kakavovo maslo	0,5	0,16	4,9				
Kokosovo olje	1,8	0,25	0,17	0,33	1,1	0,1	0,44
Laneno olje	0,54		57	0,75			
Koruzno olje	26	0,95	75	3,3	1,5		2
Olivno olje	12	0,1	1,3				
Palmino olje	7,4				6,3	0,82	11
Repično olje	19		49	1,2			
Olje zafranike	45	1,2	2,3	0,65			
Sezamovo olje	0,37	1,4	25	2,1			
Sojino olje	9,5	1,3	70	29			
Sončnično olje	62	2,3	2,7				
Olje grozdnih pečk	29		31	2			
Orehovo olje	0,44		28	3,8			
Olje pšeničnih kalčkov	151	31	53	2,1	3,6		
Indijski oreščki	0,26		5,2	0,23			
Kostanj	0,5		7				
Arašidi	10	0,27	8,3	0,17			
Lešniki	26		1,9				
Kokos	0,7		0,25				
Mandlji	26	0,16	0,87	0,02	0,24		0,02
Brazilski oreščki	6,5		11				
Pekani	1,2		19				
Pistacije	5,2						
Orehi	1,9		41	0,2			
Ajda	0,2	0,1	5,7	0,3	0,1		0,1
Ječmen	0,31	0,03	0,04	0,01	1,1	0,27	0,47
Oves	0,47	0,08			1,1	0,17	
Ovseni kosmiči	0,8	0,1			2	0,3	
Proso	0,1	0,1	1,7	0,6	0,1	1,3	0,1
Koruza	1,5		4,4		0,23	0,48	
Riž polnozrnat	0,6	0,1	0,1	0,1	0,4		0,7
Riž oluščen	0,1	0,1	0,1		0,1		0,3
Rž	1,4	0,36			1,4		
Pšenica	1	0,38			0,27	2,4	
Soja	0,64		8,2				

2.3.2 Presnova vitamina E

Pri absorpciji vitamina E sodelujejo žolčne soli in sok trebušne slinavke. Iz črevesja se absorbira skupaj z maščobnimi kislinami, monogliceridi in ostalimi v maščobi topnimi vitamini, ki preidejo apikalno membrano absorptivnih celic v črevesnih resicah in se združijo v hilomikrone. Absorpcija je največja v srednjem delu tankega črevesa. Pri sesalcih se iz črevesja prenese v limfo, pri pticah pa se po portalni veni prenese neposredno v jetra (Machlin, 1991). Ne glede na obliko se vse oblike vitamina E enako absorbirajo, količina absorbirane oblike pa je odvisna od koncentracije, ki jo organizem dobi s hrano (Brody, 1998). V krvnem obtoku so hilomikroni izpostavljeni delovanju encima lipoprotein lipaza, zaradi česar nastanejo hilomikronski ostanki. Vitamin E, ki je vezan v hilomikronskih ostankih, se prenese v jetra in se tam vgradi v VLDL. Vanje se zaradi delovanja α -TTP vgrajuje predvsem α -tokoferol (Bramley in sod., 2000). Zaradi nizke afinitete tega proteina do ostalih oblik vitamina E, se le-te veliko slabše prenašajo na VLDL. Zato v krvi in tkivih najdemo veliko manjše količine teh oblik. Večina se jih namreč izloči z blatom (Ju in sod., 2010). VLDL, ki krožijo po krvnem obtoku, oddajajo triacilglicerole različnim tkivom, tako nastanejo LDL. Nekaj vitamina E ostane vezanega v LDL, nekaj pa se ga prenese na HDL. Ti dve vrsti prenašalcev si med seboj pogosto izmenjujeta molekule vitamina E, brez da bi pri tem posredoval kak prenašalni protein (Traber, 1994, cit. po Halliwell in Gutteridge, 2000). Molekule vitamina E se v celice lahko vgradijo na različne načine:

- pri receptorsko posredovanem sprejemu LDL,
- pri hidrolizi hilomikronov in VLDL, ki jo regulira lipoprotein lipaza,
- pri prenosu s pomočjo HDL (Gropper in sod., 2009).



Slika 4: Presnova vitamina E (prirejeno po Wagner in sod., 2004)
Figure 4: The vitamin E metabolism (adapted from Wagner et al., 2004)

Zaradi različnih količin tokoferolov v oljih, ki so največji vir vitamina E, se glede na to, katero olje zaužijemo, v plazmi lahko pojavljajo različne količine tokoferolov. V ZDA na primer s hrano zaužijejo večje količine γ -tokoferola, medtem ko v Evropi zaužijemo večje količine α -tokoferola, saj se v Evropi zauživa večinoma olivno in sončnično olje, ki sta dober vir α -tokoferola, v ZDA pa z γ -tokoferolom bogato koruzno olje (Zingg in Azzi, 2004).

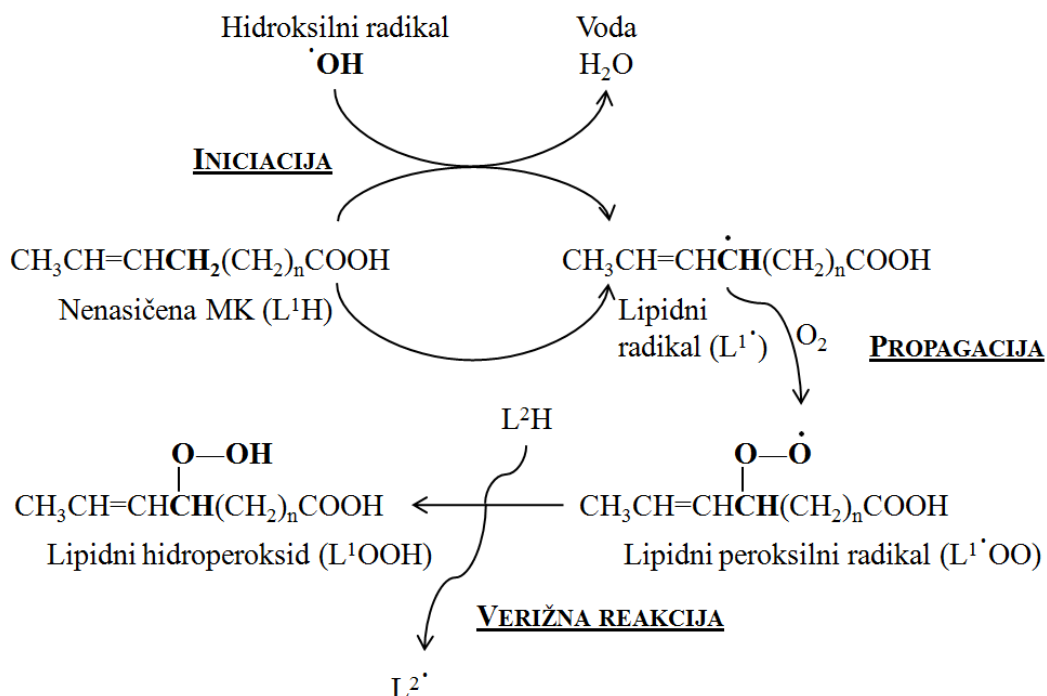
2.3.3 Antioksidativno delovanje α -tokoferola

Najpomembnejša biološka lastnost vitamina E je njegovo antioksidativno delovanje. Je najbolj učinkovit v maščobi topen antioksidant, saj pripomore k stabilnosti celičnih membran. Vitamin E ščiti celične strukture pred kisikovimi prostimi radikali in produkti lipidne peroksidacije (Meydani, 1995). Tokoferoli in tokotrienoli zelo hitro reagirajo s prostimi radikali in jih odstranijo, še preden ti reagirajo z maščobnimi kislinami ali z membranskimi proteini (Halliwell in Gutteridge, 2000). Deluje v povezavi z drugimi

molekulami, kot so reducirani glutation in askorbinska kislina, ter encimi, na primer glutation peroksidazo, superoksid dismutazo in katalazo. S tem zaščiti celice pred poškodbami kisikovih radikalov (Eitenmiller in Lee, 2004).

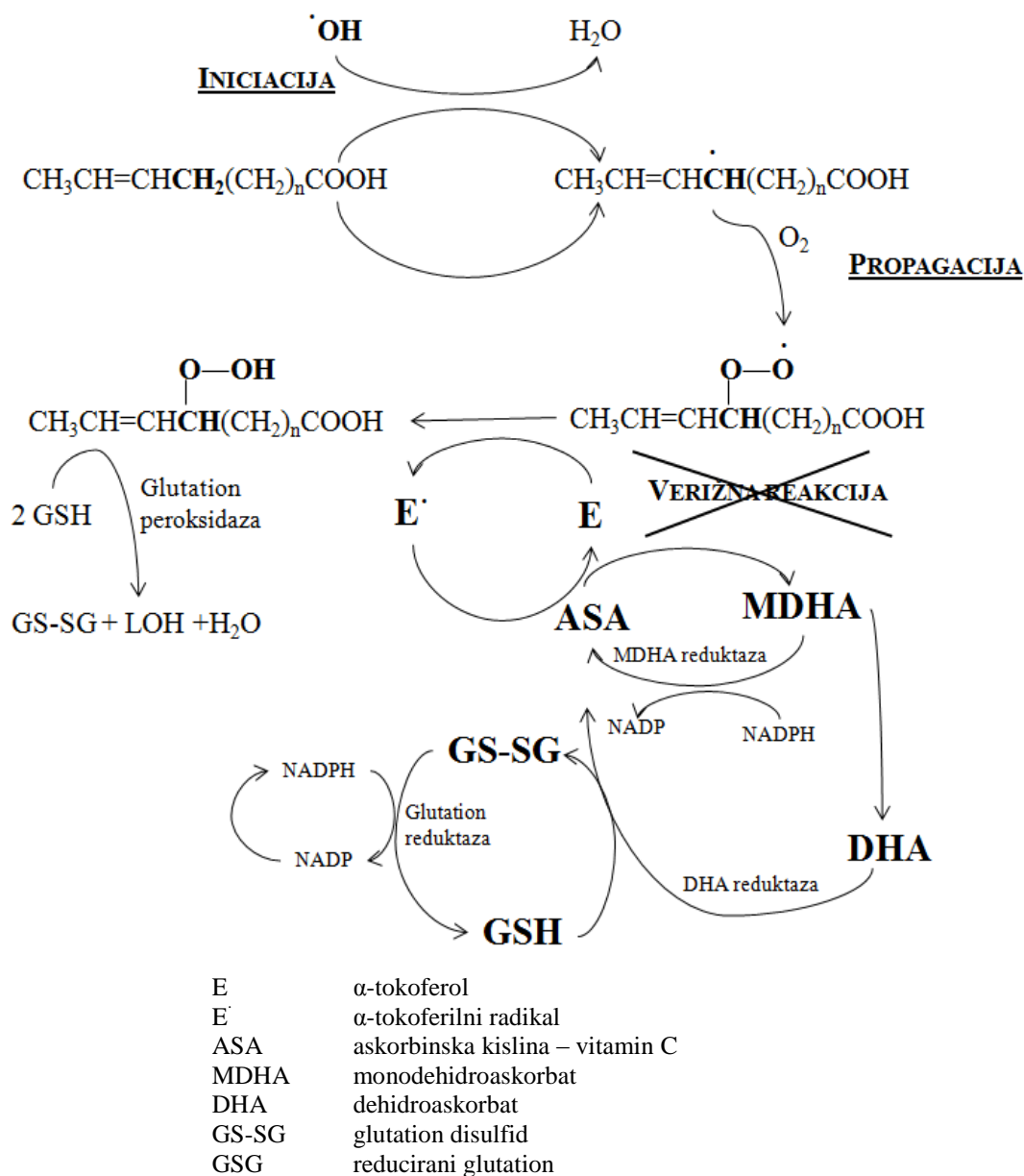
Z reakcijami prostih radikalov povezujejo razvoj bolezni kot so sladkorna bolezen, Alzheimerjeva bolezen in druge nevrodegenerativne bolezni, ateroskleroza, ki v vodi v nastanek srčno-žilnih bolezni ter nekatere vrste raka. Zato je odkrivanje delovanja mehanizmov prostih radikalov predmet številnih raziskav. Razumevanje nastanka bolezni je namreč ključno za odkrivanje antioksidantov, s katerimi lahko preprečimo nastanek teh bolezni in za njihovo zdravljenje (Seifried in sod., 2007). Vitamin E in njegove antioksidativne lastnosti so ključnega pomena pri preprečevanju bolezni, ki so pereč problem v današnjem času. S preprečevanjem agregacije in adhezije trombocitov na stene žil in s preprečevanjem oksidacije LDL, ki vodi v nastanek ateroskleroze, ščiti pred nastankom srčno-žilnih bolezni. Pomembna je njegova funkcija pri zniževanju tveganja za pojav rakavih bolezni, saj njegovo antioksidativno delovanje zaščiti molekule DNA pred kisikovimi prostimi radikali in s tem zavira mutagenozo in transformacijo celic. Prav tako je njegovo delovanje pomembno pri pravilnem delovanju imunskega sistema, saj so imunske celice zelo dojemljive na delovanje prostih radikalov (Meydani, 1995).

α -Tokoferol je oblika vitamina E z največjo antioksidativno kapaciteto. Nahaja se v membranah celic, kjer ščiti lipoproteine pred oksidativnimi poškodbami. Prosti radikali hitreje reagirajo z α -tokoferolom kot z nenasičenimi maščobnimi kislinami, α -tokoferol na ta način zaščiti celično membrano pred poškodbami, ki jih povzročajo prosti radikali. Pri avtooksidaciji namreč pod vplivom delovanja nekaterih dejavnikov (svetloba, visoka temperatura, ionsko sevanje, kovinski ioni, delovanje encima lipooksiganeza) maščobna kislina (L^1H) odda vodikov proton in nastane lipidni radikal ($L^1\cdot$). Ta v fazi propagacije reagira s tripletnim kisikom, pri čemer nastane visoko reaktivni peroksilni radikal ($L^1OO\cdot$). Ta lahko reagira z drugo maščobno kislino, nastane hidroperoksid (L^1OOH) in nov radikal maščobne kisline ($L^2\cdot$). Ta lahko veže kisik, cikel se ponovi, vzpostavi se verižna reakcija (slika 5). Hidroperoksidi, ki nastanejo v fazi propagacije, lahko ob prisotnosti železa in bakra razpadejo in nastaneta peroksilni radikal ($L^1OO\cdot$) ali alkoksilni radikal ($L^1O\cdot$), ki še pospešita verižno reakcijo. Po drugi strani lahko razpadejo do aldehydov, ketonov, alkenov in ostalih produktov, ki se vežejo na celične makromolekule, kot so DNA in beljakovine in jih poškodujejo ali inducirajo vnetje (Bramley in sod., 2000).



Slika 5: Inicijacija in vzpostavitev verižne reakcije pri oksidaciji maščobnih kislin (MK)
 Figure 5: Initiation and propagation of fatty acid oxidation

Pri preprečevanju vzpostavitve verižne reakcije zaradi oksidacije maščobnih kislin ima pomembno vlogo α -tokoferol (slika 6). Ta odda vodikov proton lipidnim peroksilnim radikalom, pri tem nastane α -tokoferilni radikal. Ta je veliko bolj obstojen kot radikali, ki nastanejo pri oksidaciji maščobnih kislin (Eitenmiller in Lee, 2004). Vitamin C oz. askorbinska kislina nastali tokoferilni radikal reducira v njegovo aktivno obliko (Niki, 1991). Pri tem, ko askorbinska kislina donira elektron, nastajata oksidirani obliki vitamina C – monodehidroaskorbat in dehidroaskorbat, ki pa nista reaktivni in zaustavita verižno reakcijo lipidne peroksidacije. Dehidroaskorbat in monodehidroaskorbat se ob prisotnosti encimov monodehidroaskorbat reduktaza in glutation dehidroaskorbat reduktaza reducirata nazaj v vitamin C (Naidoo in Lux, 1998). Tudi reducirana oblika glutationa lahko ob prisotnosti glutation reduktaze tokoferilni radikal pretvori nazaj v α -tokoferol (Machlin, 1991).



Slika 6: Zaustavitev verizne reakcije zaradi delovanja α -tokoferola in regeneracija α -tokoferola
 Figure 6: The termination of lipid oxidation chain reaction due to the activity of α -tocopherol and the regeneration of α -tocopherol

2.3.4 Vloga γ -tokoferola

Dolgo časa se je pozornost raziskovalcev usmerjala predvsem na α -tokoferol, ki je pri ljudeh in živalih biološko najbolj razpoložljiva oblika vitamina E, zadnje čase so pogoste tudi raziskave, ki poskušajo pokazati kakšno vlogo imajo ostale oblike tokoferolov pri preprečevanju nastanka različnih degenerativnih bolezni (srčno-žilne bolezni, rak, starostno pogojena katarakta, neurodegenerativne bolezni). S tem v zvezi

se zdi najbolj zanimivo delovanje γ -tokoferola, saj naj bi ta oblika imela komplementarne učinke k delovanju α -tokoferola (Eitenmiller in Lee, 2004). Kot povzeto v preglednem članku Wagnerja in sod. (2004), je aktivnost γ -tokoferola zaradi manjše biološke razpoložljivosti v *in vivo* pogojih manjša kot delovanje α -tokoferola. γ -Tokoferol na mestu -5 na kromanolnem obroču nima vezane metilne skupine, zaradi česar prihaja do razlike v lipofilnosti v primerjavi z α -tokoferolom. Zaradi teh lastnosti najverjetneje prihaja do razlik v bioaktivnosti med tema dvema molekulama. Bieri in Poukka Evarts (1974a) sta poskušala njegovo aktivnost oceniti pri različnih vrstah živali. Pri podganah in piščancih sta ugotovila, da aktivnost γ -tokoferola znaša od 6 do 16 % aktivnosti α -tokoferola, medtem ko je bil učinek γ -tokoferola pri hrčkih manjši. Behrens in Madere (1983) sta pri podganah ugotovila povečane koncentracije plazemskega γ -tokoferola le v primeru, ko so živali s krmo prejele samo to obliko tokoferola. V primeru, ko je bil krmljen skupaj z α -tokoferolom, so bile količine γ -tokoferola v plazmi v primerjavi z α -tokoferolom osemkrat manjše.

γ -Tokoferol ima antioksidativne lastnosti, ki se razlikujejo od tistih, ki so značilne za α -tokoferol. Ta oblika vitamina E odda protone peroksilnim radikalom, pri čemer nastane γ -tokoferilni radikal. Čeprav ima zaradi odsotnosti metilne skupine na C-5 atomu na kromanolnem obroču slabše antioksidativne sposobnosti kot α -tokoferol, mu prav odsotnost te metilne skupine omogoča vezavo lipofilnih reaktivnih dušikovih spojin. γ -Tokoferol tako veliko bolje kot α -tokoferol odstranjuje dušikov oksid in v tem pogledu dopolnjuje delovanje α -tokoferola (Cooney in sod., 1995; Christen in sod., 1997). Pri reakciji dušikovega oksida s superoksidom nastane peroksinitrit, ki je eden najbolj pomembnih etioloških faktorjev, ki vplivajo na razvoj številnih bolezni. γ -Tokoferol reagira s peroksinitritom in nastane stabilna oblika 5-nitro- γ -tokoferol (Eitenmiller in Lee, 2004). V primeru, ko se dušikov dioksid veže na α -tokoferol, pride do tvorbe α -tokoferol kinona, za katerega se smatra, da je mutagena spojina. Christen in sod. (1997) so v svoji raziskavi pokazali, da γ -tokoferol učinkovito veže reaktivne dušikove spojine, pri čemer nastaja 5-nitro- γ -tokoferol. V primeru vezave na α -tokoferol nastajata dve spojini, para-kinon in α -tokoferil kinon. S tem so potrdili vlogo γ -tokoferola pri zmanjševanju posledic vnetnih procesov, v katerih reaktivne dušikove spojine nastajajo.

Antioksidativne lastnosti, ki jih ima γ -tokoferol, prihajajo do izraza predvsem v hrani in v *in vitro* pogojih. V takih situacijah se je izkazal za učinkovito molekulo, ki omogoča odstranjevanje lipofilnih elektrofilov, reaktivnih dušikovih in kisikovih spojin. V *in vivo* pogojih je njegova aktivnost manjša predvsem zaradi majhne koncentracije v plazmi (Wagner in sod., 2004). γ -Tokoferol se namreč v jetrih v veliki meri presnovi do γ -CEHC, ki se izloči z žolčem in sečem (Jiang in sod., 2001). Traber in Kayden (1989) sta ugotovili, da se α - in γ -tokoferol sicer v enaki meri absorbirata in vgrajujeta v hilomikrone, vendar v jetrih pride do razlik v prepoznavanju teh dveh tokoferolov, zato se α -tokoferol vgradi v VLDL, večina γ -tokoferola se presnovi in izloči.

Večina raziskav, ki preučuje delovanje γ -tokoferola, se ukvarja z njegovim vplivom na zdravje ljudi, saj vpliva na zmanjšanje pojavnosti srčno-žilnih bolezni (Christen in sod., 1997; Saldeen in sod., 1999), raka (Gysin in sod., 2002; Campbell in sod., 2006) ter deluje protivnetno (Jiang in sod., 2000; Morton in sod., 2002; Jiang in Ames, 2003; Wisner in sod., 2008). Učinek γ -tokoferola se je izkazal kot pomemben tudi pri bolnikih s presnovnim sindromom (Devaraj in sod., 2008). Saldeen in sod. (1999) so pri podganah preučevali antioksidativne lastnosti α - in γ -tokoferola in ugotovili, da 100 mg/kg α - oz. γ -tokoferola učinkovito pripomore k zmanjšanju koncentracije superoksidnega aniona v arterijah ter zmanjšuje lipidno peroksidacijo in oksidacijo LDL. Pri tem je bil učinek γ -tokoferola v primerjavi z α -tokoferolom večji. Odsotnost metilne skupine na mestu -5 na kromanolnem obroču pri γ -tokoferolu omogoča učinkovito vezavo nitritnega radikala (Cooney in sod., 1995; Christen in sod., 1997), ki je mutageni elektrofil in s tem zaščiti maščobe, beljakovine in nukleinske kisline (Shigenaga in sod., 1997). Raziskave, ki so preučevale delovanje γ -tokoferola, se tako osredotočajo predvsem na področja, v katerih naj bi γ -tokoferol imel veliko vlogo, to je pri boleznih, ki so posledica povečanega obsega vnetnih procesov v organizmu. γ -Tokoferol in γ -CEHC sta učinkovito zmanjšala nastajanje PGE₂, ki igra pomembno vlogo pri vnetju in z njim povezanih boleznih (Jiang in sod., 2000; Jiang in Ames, 2003). Tudi v študiji, ki so jo objavili Kuo in sod. (2008), so ugotovili protivnetno delovanje γ -tokoferola. Koncentracije protivnetnih citokinov so bile manjše pri miših, ki so bile tretirane z nanoemulzijo, ki je vsebovala γ -tokoferol. Tudi pri preučevanju alergijskih boleznih dihal – pri astmi in alergijskem rinitisu, je γ -tokoferol učinkovito zmanjšal nastajanje protivnetnih citokinov in eikozanoidov (Wagner in sod., 2007).

Veliko raziskav se osredotoča na vlogo γ -tokoferola pri rakavih obolenjih. Gysin in sod. (2002) poročajo o boljšem inhibitornem delovanju γ -tokoferola v primerjavi z α -tokoferolom pri proliferaciji celic in sintezi DNA v celičnih linijah kolona, prostate in osteosarkoma. Tudi pri miših, ki so služile kot model pri preučevanju raka prostate je prehrana bogata z γ -tokoferolom znatno zmanjšala pojav te bolezni. Huang in sod. (2003) so pri bolnikih z rakom na prostati določili manjše koncentracije γ -tokoferola v plazmi. O apoptotičnem delovanju v humanih celičnih kulturah raka na dojki MDA-MB-435 in MCF-7 poročajo Yu in sod. (2008). Prav tako se je inhibitoren učinek na rast rakavih celic pokazal pri celičnih linijah raka pljuč in pri mišjem modelu NCr-nu/nu, ki je služil za preučevanje te bolezni (Lu in sod., 2010). Zaradi večjih koncentracij γ -tokoferola v črevesju zaradi izločanja te oblike vitamina E z žolčem (Traber in Kayden, 1989), lahko pride učinkovitost te oblike pri raku debelega črevesa še toliko bolj do izraza.

γ -Tokoferol ima pomembno vlogo tudi pri zmanjševanju pojavnosti srčno-žilnih obolenj. Liu in sod. (2003) so ugotovili, da ima pripravek bogat predvsem z γ -tokoferolom boljši učinek na zmanjšanje zlepljanja trombocitov kot samo α -tokoferol.

Tudi v študiji Li in sod. (1999) se je γ -tokoferol izkazal za bolj učinkovito obliko vitamina E kot α -tokoferol pri preprečevanju nastajanja krvnih strdkov, hkrati se je zmanjšalo nastajanje superoksidnih anionov, manjši je bil obseg lipidne oksidacije in oksidacije LDL. Saldeen in sod. (1999) so v raziskavi, kjer so preučevali vpliv α - in γ -tokoferola na preprečevanje nastanka krvnih strdkov v arterijah, ugotovili boljše delovanje γ -tokoferola v tej smeri. V študiji, ki je trajala sedem let, vanjo je bilo vključenih 334 000 žensk po menopavzi, so Kushi in sod. (1996) ugotovili, da je večje zauživanje vitamina E, predvsem v obliki γ -tokoferola, povezano z manjšo pojavnostjo smrti, ki so posledica srčno-žilnih obolenj. Pri preučevanju delovanja α -tokoferola do takih zaključkov niso prišli.

2.3.5 Sinergistično delovanje α - in γ -tokoferola

Med različnimi molekulami, ki imajo antioksidativne lastnosti, prihaja do sinergističnega delovanja. Pomembno je na primer sodelovanje med vitaminom E in vitaminom C, saj je slednji sposoben reducirati oksidirano obliko tokoferolov v prvotno obliko. Prav tako se v tej povezavi kaže aktivnost β -karotena (Niki in sod., 1995). O sinergističnem delovanju α - in γ -tokoferola so sklepali Tomasch in sod. (2001). V raziskavi so preučevali, kakšen je antioksidativen učinek teh dveh oblik vitamina E. V prehrano zdravih prostovoljcev so vključili različne vire maščobe. Ena skupina je prejela 80 g koruznega olja, ki vsebuje velike količine γ -tokoferola, druga skupina pa enako količino mešanice olivnega in sončničnega olja z majhno vsebnostjo γ -tokoferola. Koncentracija malondialdehida (MDA) se med obema skupinama ni razlikovala, so pa avtorji glede na to, da ima koruzno olje večji delež VNMK predpostavili, da ima γ -tokoferol večji učinek pri preprečevanju oksidacije maščob kot α -tokoferol. Malondialdehid je namreč pokazatelj oksidacije maščobnih kislin z več kot dvema nenasičenima vezema.

Učinek mešanice tokoferolov (100 mg γ -tokoferola, 40 mg δ -tokoferola in 20 mg α -tokoferola) je imel večji učinek na preprečevanje zlepljanja trombocitov v primerjavi s 100 mg α -tokoferola. Prav tako se je ta mešanica tokoferolov izkazala za bolj učinkovito pri delovanju na antioksidativne encime in na sproščanje dušikovega oksida (Liu in sod., 2003). Yamashita in sod. (1992) so preučevali učinek α - in γ -tokoferola in učinkovitost γ -tokoferola v kombinaciji z lignani iz sezamovih semen ter ugotovili, da je delovanje γ -tokoferola v kombinaciji s sezamovimi lignani primerljivo z delovanjem α -tokoferola, medtem ko γ -tokoferol sam ni bil učinkovit. Mešanica različnih tokoferolov, ki je vsebovala 75 mg α -tokoferola, 315 mg γ -tokoferola in 110 mg δ -tokoferola na dan je zmanjšala nivo F_2 izoprostanov pri bolnikih s sladkorno boleznijo v enaki meri kot α -tokoferol (500 mg/dan), učinek na zmanjšanje levkotriena B_4 se je pokazal le pri skupini, ki je prejela mešanico tokoferolov. Glede na rezultate lahko sklepamo na primerljive učinke α -tokoferola in mešanice tokoferolov na preprečevanje

oksidacijskega stresa ter na poglavitno vlogo mešanice pri zmanjšanju vnetnih procesov (Wu in sod., 2007). Clément and Bourre (1997) sta upoštevaloč rezultate svoje študije predlagala, da naj bi se ob visoki vsebnosti γ -tokoferola v krmi bioaktivnost α -tokoferola spremenila. Pri preučevanju delovanja teh dveh tokoferolov sta ugotovila, da se ob krmljenju γ -tokoferola podganam koncentracija tako α - kot γ -tokoferola v krvnem serumu bolj poveča kot pri krmljenju le α -tokoferola.

2.3.6 Vitamin E v prehrani piščancev

Zaradi zahtev potrošnikov in zdravstvenih strokovnjakov, ki zagovarjajo dodajanje antioksidantov naravnega izvora v hrano, se vitamin E velikokrat dodaja v krmo živalim (Botsoglou in sod., 2010), saj je pomemben zaradi preprečevanja kvarjenja proizvodov, ki so zaradi večje vsebnosti VNMK podvrženi lipidni oksidaciji. n-3 VNMK se v prehrani piščancev uporabljajo predvsem zaradi ugodnega učinka, ki jih imajo na zdravje ljudi. Teh esencialnih maščobnih kislin se v prehrani sodobnega človeka nahaja premalo, z njimi obogateno meso ali mesni izdelki pa učinkovito prispevajo k njihovemu večjemu vnosu. Večje zauživanje n-3 VNMK učinkovito pripomore k zmanjšanju tveganja bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, povišan krvni tlak, artritis, sladkorna bolezen, rak in druge avtoimunske in vnetne bolezni (Simopoulos, 1991).

Piščanci s standardno prehrano dobijo predvsem n-6 VNMK, z dodajanjem dodatkov in krmil, ki vsebujejo veliko n-3 VNMK, lahko vplivamo na maščobnokislinsko sestavo njihovega mesa, saj se maščobnokislinska sestava krme odraža v maščobnokislinski sestavi mesa (Woods in Fearon, 2009).

Ker so VNMK zaradi prisotnosti nenasičenih vezi med ogljikovimi atomi podvržene oksidaciji, je potrebno v krmo dodati antioksidante, ki preprečujejo oksidativne poškodbe tako v krmi, kot tudi v organizmu in posledično mesu živali, kar pripomore tudi k večji obstojnosti tovrstnih proizvodov. Ti so zaradi povečanega obsega oksidacije bolj nagnjeni h kvarjenju, prizadeta sta lahko tudi videz in okus mesa ter mesnih izdelkov (Wood in sod., 2003).

Za preprečevanje oksidacije maščob se v prehrani živali uporablja α -tokoferol, ki ima največjo biološko vrednost med vsemi oblikami vitamina E (Meydani, 1995). Nalaganje α -tokoferola v živalska tkiva je odvisno od količine, ki jo živali zaužijejo, s tem je povezana oksidativna stabilnost mesa in mesnih proizvodov (Jensen in sod., 1997; Narciso-Gaytán in sod., 2010). Številne raziskave so z dodajanjem α -tokoferola v krmo piščancev potrdile izboljšanje produktivnosti živali (Guo in sod., 2001), boljše oksidativno stabilnost mesa (Lauridsen in sod., 1997; Cortinas in sod., 2005; Voljč in sod., 2011) ter povečano vsebnost vitamina E v živalskih tkivih (Lauridsen in sod., 1997; Flachowsky in sod., 2002). Raziskave so potrdile, da lahko na podaljšanje

obstojnosti mesa vplivajo tudi drugi antioksidanti naravnega izvora v kombinaciji z α -tokoferolom. O sinergističnem delovanju α -tokoferola in α -lipoične kisline pri piščancih poročajo Yasin in sod. (2012), pri puranih so sinergističen učinek med eteričnim oljem origana in α -tokoferolom zaznali Botsoglou in sod. (2003), ugoden vpliv pri govejem mesu je imela kombinacija α -tokoferola in rastlinskega ekstrakta bogatega s polifenoli (Gobert in sod., 2010).

Raziskave, ki bi preučevale delovanje γ -tokoferola pri piščancih, so sicer redke, so pa Bottje in sod. (1995) ugotovili, da imajo piščanci, oboleli za pljučno hipertenzijo, manjše količine tako α - kot tudi γ -tokoferola v pljučih in jetrih, kar nakazuje na njegovo antioksidativno delovanje.

2.4 VPLIV VITAMINA E NA TRANSKRIPCijo GENOV

2.4.1 Nutrigenetika in nutrigenomika

V času različnih »omik« je prehranska znanost predstavila dva pojma, ki povezujeta prehrano in genetiko: nutrigenetiko in nutrigenomiko. To sta vedi, ki preučujeta interakcije med hranili in geni, vendar za razrešitev mehanizmov, kako hranila vplivajo na razvoj bolezni, uporabljata različne pristope (Frank in sod., 2006). Nutrigenetika teži k razumevanju tega, kako genetski profil posameznika koordinira odziv na prehrano. Teži k identifikaciji in karakterizaciji genskih variant povezanih z različnimi odzivi na hranila in kako jih povezati z bolezenskimi stanji. V nasprotju s karakteristikami nutrigenetike, nutrigenomika s pomočjo orodij funkcionalne genomike preučuje vpliv posameznih hranil na transkriptom, proteom in metabolom celic, tkiv ali celotnega organizma. Poleg tega se ukvarja z identifikacijo genov, ki vplivajo na razvoj s prehrano povezanih bolezni. V prehranske raziskave vnaša nove pristope in preko visoko tehnoloških eksperimentalnih procesov odkriva odziv posameznika na sestavine hrane, pri tem pa uporablja tehnologije genomike, proteomike, transkriptomike in metabolomike (Raqib in Cravioto, 2009).

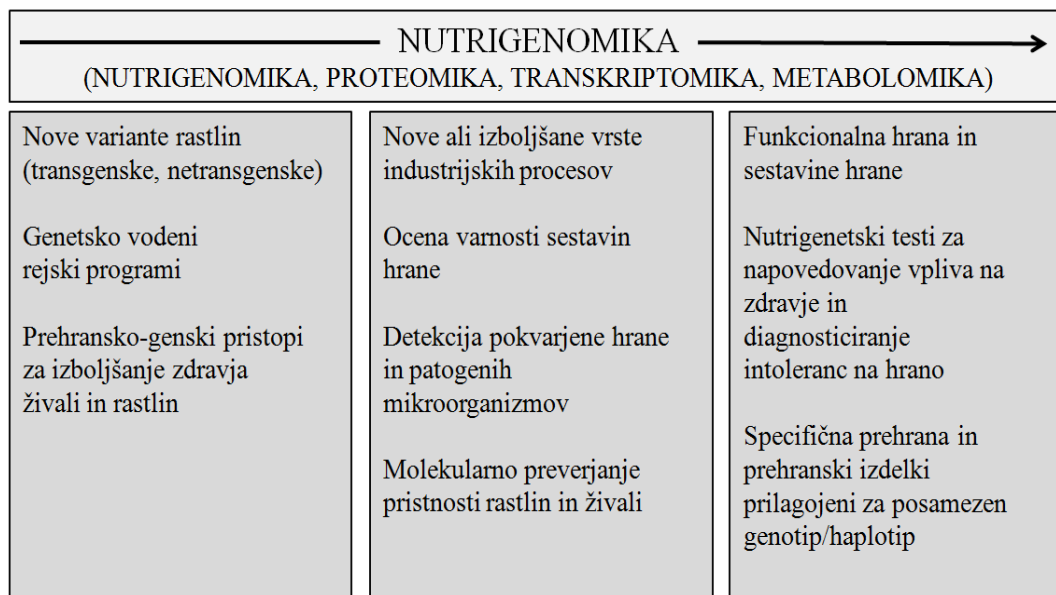
Transkriptomika je po navadi prva v vrsti različnim »omik«, ki se uporabljajo za preučevanje vpliva prehrane na genom. S pomočjo transkriptomike dobimo informacije o tem, kateri geni in na kakšnem nivoju so izraženi. Preliminarne analize s pomočjo tehnologije mikromrež nam omogočajo tudi izbiro drugih tehnologij, ki bi bile primerne za preučevanje izbranega problema (McGettigan, 2013). Veliko esencialnih hranil in bioaktivnih komponent hrane (funkcionalna hrana) služi kot pomemben regulator izražanja genov s tem, ko spreminjajo transkripcijo in translacijo genov in s tem vplivajo na metabolizem, celično rast in diferenciacijo. Ti procesi so pomembni pri razvoju različnih bolezni. Tehnologija DNA mikromrež omogoča simultano oceno transkripcije tisočih genov in njihovo relativno izražanje pred in po izpostavi različnim

hranilom (Raqib in Cravioto, 2009). Omogoča simultano analizo izražanja velikega števila genov in s tem nadgrajuje tradicionalne metode, ki se uporabljajo za preučevanje izražanja genov (RT-qPCR, prenos northern) (Spielbauer in Stahl, 2005). Trenutno je to najmočnejše orodje transkriptomike, saj omogoča meritve na vseh transkriptih in njihovih variantah (alternativno izrezovanje) genoma določene vrste.

Proteomika je veda, ki preučuje značilnosti proteinov (na nivoju izražanja, post-translacijske modifikacije, interakcije), z namenom poznavanja mehanizmov različnih bolezni, celičnih procesov in povezav med njimi na nivoju proteinov (Blackstock in Weir, 1999). Metabolomika preučuje globalni presnovni profil sistema, od celic, tkiv do celotnega organizma pod vplivom delovanja preučevanih dejavnikov. Preučevanje metaboloma je izjemno zahtevno zaradi raznolikosti kemijske narave presnovkov. Ti so rezultat interakcije med genomom sistema in okoljem ter niso zgolj končni produkti izražanja genov (Rochfort, 2005).

2.4.2 Nutrigenomika v kmetijstvu

Nutrigenomika postaja pomemben pripomoček tudi v kmetijskih vedah. Z možnostjo napovedovanja odziva živali na prehranske intervencije bi kot pomemben pripomoček v živinoreji lahko doprinesla k zmanjšanju proizvodnih stroškov in povečevanju presnovne učinkovitosti, pripomogla k boljši rasti in plodnosti, preprečevanju bolezni in optimiziranju koristnih sestavin v mesu in mleku. Preko študij, ki preučujejo izražanje genov in preko profiliranja izražanja genov na nivoju mRNA ali proteinov nutrigenomika omogoča vpogled v mehanizme, ki vodijo fiziološke funkcije in v njihovo regulacijo pri domačih živalih (Cassar-Malek in sod., 2008).



Slika 7: Primer uporabe orodij nutrigenomike v prehranski industriji z namenom povečevanja ekonomskih koristi in izboljševanja prehrane in zdravja ljudi (Brown in van der Ouderaa, 2007)
Figure 7: An example of the use of nutrigenomic tools in the food industry for economic benefits and to improve human nutrition and health (Brown and van der Ouderaa, 2007)

2.4.3 Vpliv vitamina E na transkripcijo genov

Pomembno vlogo pri regulaciji transkripcije genov imajo antioksidanti. Delujejo lahko kot signalne molekule in vplivajo na pomembne korake, ki so vpleteni v izražanje genov. S spreminjanjem aktivnosti transkripcijskih faktorjev lahko opazno spremenijo mRNA in koncentracije proteinov. Na izražanje genov lahko vplivajo preko vezave na celične receptorje in s spreminjanjem delovanja ključnih encimov, kot so fosfataze in kinaze (Frank in sod., 2006).

Tokoferoli vplivajo na regulacijo velikega števila genov, delno preko regulacije encimov protein kinaza C in fosfatidolinozitol 3-kinaza, delno pa neodvisno od njenega delovanja. Gene, na katere vplivajo tokoferoli, lahko razdelimo v pet skupin. V prvi so geni, ki so vpleteni v prevzem in degradacijo tokoferolov, v drugi geni, ki so povezani s prevzemom maščob in aterosklerozo, v tretji geni vpleteni v modulacijo ekstracelularnih proteinov, v četrti geni, ki so vpleteni v adhezijo in vnetja, v peti geni, ki vplivajo na celično signalizacijo in regulacijo celičnega cikla (Azzi in sod., 2004). Vitamin E je vpleten v spremembe pri izražanju genov, ki kodirajo molekule vpletene v antioksidativno delovanje, na primer glutationa (Barella in sod., 2004), vpliva na povišano izražanje CYP (Sontag in Parker, 2002), na znižano izražanje gena za odstranjevalni receptor CD36 (Ricciarelli in sod., 2000) in odstranjevalni receptor A (*angl.* scavenger receptor A), s čimer pripomore k uničenju oksidiranih lipoproteinov s

pomočjo makrofagov (Teupser in sod., 1999). Poleg tega vitamin E znižuje m-RNA jetrnega kolagena (Chojkier in sod., 1998), vpliva na znižano izražanje genov, ki so vpleteni v ključne korake biosinteze holesterola (Valastyan in sod., 2008) in tistih, ki kodirajo molekule vpletene v celične cikle (De Pascale in sod., 2006). Poleg tega vpliva na izražanje genov, ki so povezani z vnetnimi procesi (Yoshikawa in sod., 1998). Rota in sod. (2005) so pri preučevanju vloge vitamina E v hipokampusu pri podganah ugotovili vpliv α -tokoferola na transkripcijo genov, ki omogočajo odstranjevanje amiloida beta in s tem sklepali na funkcijo vitamina E pri preprečevanju razvoja Alzheimerjeve bolezni. O znižano izraženem genu za GCS in s tem na antioksidativno obrambo pri pomanjkanju vitamina E poročajo Fischer in sod. (2001). Podobne rezultate so dobili tudi Rimbach in sod. (2004), ki so preučevali izražanje genov na mRNA nivoju v jetrih podgan, ki so bile dalj časa izpostavljene pomanjkanju tega vitamina.

Večina raziskav se tudi na tem področju osredotoča na α -tokoferol, študije ki so preučevale vpliv γ -tokoferola, so bile večinoma izvedene na celičnih linijah, ki služijo za preučevanje rakavih obolenj. γ -Tokoferol je na primer vplival na povišano izražanje PPAR γ v celičnih linijah raka kolona bolj kot α -tokoferol (Campbell in sod., 2006). V ovčji maternici sta obe obliki tokoferolov podobno vplivali na izražanje gena za PPAR γ (Kasimanickam R. K. in Kasimanickam V. R., 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PREHRANSKI POSKUS

Prehranski poskus smo opravili v poskusnem hlevu Katedre za prehrano, na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Vanj smo vključili 46 en dan starih piščancev provenience ROSS 308 in jih s poskusno krmo krmili do starosti 30 dni. Takrat smo piščance žrtvovali in odvzeli vzorce krvi in tkiv za nadaljnje analize.

Piščanci so bili vhlavljeni v skupinske bokse. Temperatura zraka v prostoru na začetku je bila 30 °C, nato smo temperaturo do 21. dne postopoma zmanjševali do 21 °C. Piščanci so bili 16 ur na svetlobi in 8 ur v temi. Razdelili smo jih v pet skupin in jih krmili s krmo sestavljeno pretežno iz pšenice in sojinih tropin z dodatkom 5 % maščobe (Pregl. 4). Krmo smo zmešali v mešalnici Oddelka za zootehniko pred začetkom poskusa in nato vsakih deset dni, jo hranili pri temperaturi -20 °C in dan pred krmljenjem pri sobni temperaturi odtalili. Po mešanju smo odvzeli vzorce vsake krme in jih shranili pri -20 °C.

V poskus smo vključili dve kontrolni skupini, in sicer negativno in pozitivno kontrolno skupino (Kont-, N=10 in Kont+, N=10). Negativna kontrola je prejela palmino mast, ki ni podvržena lipidni oksidaciji, saj vsebuje pretežno nasičene maščobne kisline (NMK), Kont+ pa laneno olje, ki je zaradi visoke vsebnosti VNMK podvrženo lipidni oksidaciji. Zaradi visoke vsebnosti vitamina E v lanenem olju smo zaradi poznavanja točno določene količine tega vitamina v krmi, s pomočjo deodorizacije le-tega odstranili. V ta namen smo olje zmešali s 15 % belilne zemlje, mešanico stresali na stresalniku 3 ure, centrifugirali 5 min pri 2000 × g, nato olje odlili, prepihali z dušikom in shranili pri -20 °C.

Kontrolni skupini sta dobili dodatek vitamina E, ki naj bi po priporočilih NRC (1994) zadostil osnovnim potrebam piščancev pitancev, to je 10 IU/kg oziroma 10 mg/kg v obliki α -tokoferil acetata. Ostale tri skupine so prejemale večje količine vitamina E (Pregl. 4). Skupina α (N=10) je dobila 100 IU, oziroma 67 mg/kg α -tokoferola v obliki RRR- α -tokoferola (T3636, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemčija), skupina γ (N=8) 67 mg/kg RRR- γ -tokoferola (T1782, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemčija), skupina $\alpha+\gamma$ (N=8) njuno kombinacijo (33,5 mg/kg RRR- α -tokoferola + 33,5 mg/kg RRR- γ -tokoferola). Tokoferole smo pred mešanjem raztopili v lanenem olju in jih nato zmešali v preostalo krmno mešanico. Piščancem smo krmili tri različne krmne mešanice, prirejene potrebam piščancev glede na njihovo starost. Do 10. dneva starosti smo krmili štarter z dodatkom premiksa za štarter, od 11. do 20. dneva smo krmili štarter z dodatkom premiksa za grover in po 20. dnevu finiŝer z dodatkom premiksa za grover (Pregl. 5). Źivali so imele

krmo in vodo vedno na voljo. V vzorcih krme, ki smo jih odvzeli pri mešanju, smo določili kemijsko in maščobnokislinsko sestavo ter vsebnost vitamin E (Pregl. 6).

Preglednica 4: Sestava krmnih mešanic ter vir dodane maščobe in vitamina E

Table 4: Feed composition and the source of fat and vitamin E

	Kont-	Kont+	α	γ	$\alpha+\gamma$
Sestava krmne mešanice – štarter (g/kg)					
Pšenica	545,5	545,5	545,5	545,5	545,5
Sojine tropine	353,8	353,8	353,8	353,8	353,8
Palmina mast	50	/	/	/	/
Laneno olje	/	50	50	50	50
Sol	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
CaCO ₃	15,9	15,9	15,9	15,9	15,9
MCaP	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
L-lizin 78,8 %	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
DL-metionin 98 %	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
Treonin 98 %	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Premiks	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Kokcidiostatik - Na-monezin	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Sestava krmne mešanice – finiŝer (g/kg)					
Pšenica	658	658	658	658	658
Sojine tropine	252	252	252	252	252
Palmina mast	50	/	/	/	/
Laneno olje	/	50	50	50	50
Sol	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
CaCO ₃	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3
MCaP	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7
L-lizin 78,8 %	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DL-metionin 98 %	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
Treonin 98 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Premiks	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Kokcidiostatik - Na-monezin	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Dodatek vitamina E (mg/kg)					
α -tokoferil acetat	10	10	/	/	/
RRR- α -tokoferol	/	/	67	/	33,5
RRR- γ -tokoferol	/	/	/	67	33,5

Na koncu poskusa smo odvzeli vzorce krvi in tkiv za nadaljnje analize. Kri smo odvzeli v različne vakuumske epruvete BD (Becton Dickinson and Company, ZDA). Vzorce krvi za kometni test smo odvzeli v 2 ml epruvete z antikoagulantom EDTA, vzorce za analize MDA in koncentracije vitamina E v 4 ml epruvete z antikoagulantom EDTA, vzorce za analize merjenja antioksidativne kapacitete v maščobi topnih spojin (ACL) in antioksidativne moči redukcije železa (FRAP) ter določitve holesterola in trigliceridov v krvi smo odvzeli v 4 ml epruvete z Li-heparinom. Po centrifugiranju (15 minut, 4 °C, 1000 × g), smo plazmo prenesli v plastične 1,5 ml Eppendorf epruvete in jih do analiz shranili na -70 °C.

Preglednica 5: Sestava premiksa

Table 5: Premix composition

	Štarter	Grover
Minerali		
Cu (mg/kg)	16	16
I (mg/kg)	1,25	1,25
Fe (mg/kg)	40	40
Mn (mg/kg)	120	120
Se (mg/kg)	0,3	0,3
Zn (mg/kg)	100	100
Vitamini		
A (IU/kg)	12000	10000
D3 (IU/kg)	5000	5000
K (mg/kg)	3	3
Biotin - B7 (mg/kg)	0,2	0,2
Folna kislina (mg/kg)	2	1,75
Tiamin - B1 (mg/kg)	3	2
Riboflavin - B2 (mg/kg)	8	6
Nikotinska kislina - B3 (mg/kg)	55	55
Pantotenska kislina - B5 (mg/kg)	13	13
Piridoksin - B6 (mg/kg)	5	4
Cianokobalamin - B12 (mg/kg)	0,02	0,02
Holin (mg/kg)	1600	1500

Pri žrtvovanju smo odvzeli vzorce jeter, prsne in stegenske mišice, srca, trebušne maščobe in možganov. Prsno in stegensko mišico smo razdelili na štiri dele in jih hranili pri različnih pogojih:

- sveži,
- 6 dni v hladilniku (4 °C),
- 2 meseca v zamrzovalniku (-20 °C),
- 4 mesece v zamrzovalniku (-20 °C).

Vzorce smo shranili v PVC ZIP vrečke pri -70 °C. Posebej smo odvzeli tudi del jeter iz katerega smo kasneje izolirali RNA.

Preglednica 6: Kemijska analiza krmnih mešanic
Table 6: Chemical analysis of feed mixtures

	Kont-	Kont+	α	γ	$\alpha + \gamma$
Kemijska analiza krmnih mešanic (g/kg)*					
Suha snov	860	891	888	889	889
Surove beljakovine	188	194	198	198	196
Surove maščobe	63	61	62	62	62
Surova vlaknina	33	32	34	36	34
Surovi pepel	52	54	50	52	51
Brezdušični izvleček	525	550	544	543	546
Vsebnost vitamina E (mg/kg)					
α -tokoferol	16,9	8,5	73,8	6,9	39,9
γ -tokoferol	10,2	4,2	4,5	58,8	35,6
Prevladujoče maščobne kisline (% od skupnih maščobnih kislin)					
C16:0	37,7	8,9	8,7	8,8	8,7
C18:0	42,7	4,0	3,8	3,8	3,8
C18:1	3,6	18,9	19,0	19,0	19,0
C18:2 n-6	12,5	26,5	26,3	26,5	26,5
C18:3 n-3	1,3	40,5	41,0	40,8	40,8
NMK	82,4	13,6	13,2	13,2	13,2
ENMK	3,8	19,3	19,5	19,4	19,5
VNMK	13,8	67,1	67,4	67,4	67,3
n-3 VNMK	1,3	40,5	41,0	40,8	40,8
n-6 VNMK	12,5	26,5	26,3	26,6	26,5
n-3/n-6 VNMK	9,7	0,7	0,6	0,7	0,7

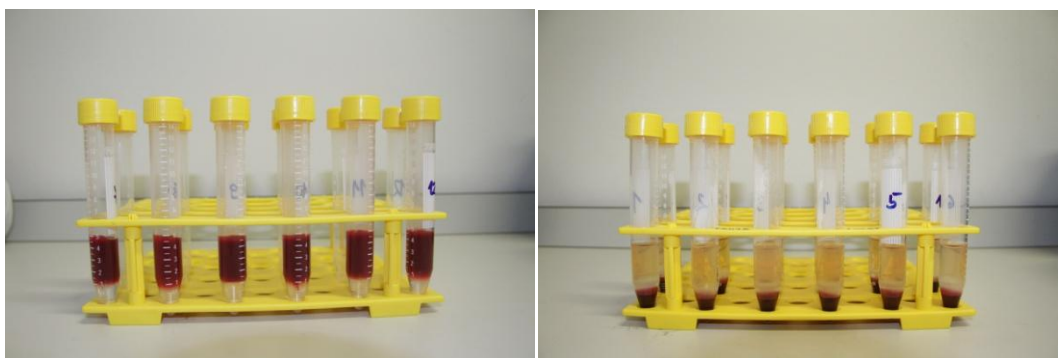
*Vrednosti predstavljajo povprečje rezultatov dveh analiz na vzorec

MK – maščobne kisline, NMK - nasičene MK , ENMK - enkrat nenasičene MK, VNMK - večkrat nenasičene MK

3.2 DOLOČANJE POŠKODB DNA LIMFOCITOV – KOMETNI TEST

3.2.1 Izolacija limfocitov

Limfocite smo iz krvi piščancev izolirali po modificirani metodi, ki smo jo povzeli po Singhu (1997). Dvema mililitroma krvi smo dodali 2 ml RPMI-1640 medija in mešanico previdno prelili v 14 ml centrifugirne epruvete, v katere smo že prej odpipetirali 1,25 ml Histopaque-1077. Po centrifugiranju (25 minut, $300 \times g$) smo dobili dva ločena sloja (slika 8). Plast, v kateri so se nahajali limfociti, smo prenesli v drugo centrifugirno epruveto z 2,5 ml RPMI-1640 medija in ponovno centrifugirali (5 minut, $300 \times g$). Postopek smo dvakrat ponovili, nato pelet limfocitov, ki je ostal na dnu epruvete, z vrtinčnikom razbili in mu dodali LMP agarozo v razmerju 1 : 5.



Slika 8: Izolacija limfocitov iz piščančje krvi
Figure 8: Lymphocyte isolation from chicken blood

3.2.2 Kometni test

Kometni test smo izvedli po postopku, ki so ga opisali Singh in sod. (1988) z manjšimi spremembami. Limfocite, ki smo jih izolirali iz krvi, smo vključili v agarozne gele, ki smo jih pripravili na hrapavih objektnih stekelcih. Vzorec vsake živali smo pripravili v dveh ponovitvah, poleg smo pripravili še pozitivno kontrolo (kontrola pravilnega poteka postopka) tako, da smo nekaj posebej v ta namen pripravljenih gelov za 3 minute potopili v 10 μ M raztopino H_2O_2 v 10 mM PBS pri 4 °C. Po spiranju s PBS smo z njimi ravnali po istem postopku kot z ostalimi geli.

Priprava gelov:

1. sloj: 400 μ l 1 % NMP agaroze, raztopljene v 10 mM PBS. Razmaze smo preko noči posušili pri sobni temperaturi.
2. sloj: na posušen prvi sloj smo nanesti 700 μ l 0,6 % NMP agaroze (raztopljene v 10 mM PBS) in jo enakomerno nanesti s pritiskom na drugi, gladki objektnik. Gel smo 10 min utrjevali na ledeni plošči.
3. sloj: 0,6 % LMP agarozo (raztopljena v 10 mM PBS) smo zmešali z izoliranimi limfociti v razmerju 1 : 5 in jo shranili v vodni kopeli pri stalni temperaturi 37 °C. 500 μ l te agaroze smo nanesti na drugi sloj gela in ponovno pokrili z gladkim objektnikom. Gele smo ponovno utrjevali 10 min na ledeni plošči v temi.
4. sloj: za zadnji sloj gela smo pripravili 0,5 % LMP agarozo v 10 mM PBS, temperirane na 37 °C in jo 500 μ l nanesti na tretji sloj agaroze. Ponovno smo jo pokrili z objektnikom in 10 min utrjevali na ledeni plošči v temi.

Za pripravo 1 l PBS raztopine potrebujemo 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 in 11,5 g Na_2HPO_4 . Za pripravo delovne raztopine potrebujemo 100 ml osnovne raztopine PBS in 900 ml MQ.

Alkalna liza:

Utrjenim gelom smo odstranili objektnik in jih za eno uro položili v posodo s pripravljeno raztopino, v kateri je potekala alkalna liza pri 4 °C. Za pripravo enega litra raztopine za alkalno lizo potrebujemo: 69,6 g NaCl, 1,2 g NaOH, 5 g N-lavrilsarkonizata, 100 ml DMSO in 1 ml Tritona X-100.

Elektroforeza:

Po alkalni lizi smo gele 3-krat v eni uri sprali z elektroforetskim pufrom, nato gele položili v elektroforetske kadi (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia Biotech), jih prelili z elektroforetskim pufrom in kadi priključili na izvor napetosti Power Supply EPS 601. Pokrili smo jih z aluminijsko folijo, elektroforeza je potekala 20 min v temi pri napetosti 25 V in toku 300 mA.

Elektroforetski pufer: za pripravo pufera potrebujemo 10 M NaOH (400g/1000 ml raztopine) in 1 M EDTA (372,2 g/1000 ml MQ). Za pripravo 1 l delovne raztopine v MQ odpipetiramo 3 ml 10 M NaOH in 2 ml 1M EDTA in ohladimo na 4 °C.

Nevtralizacija:

Po končani elektroforezi smo gele nevtralizirali s pomočjo Tris-HCl pufera. Minigele smo potopili v delovno raztopino in jih v temi namakali 15 minut. Pufer smo v tem času 3-krat zamenjali.

Osnovna raztopina 1M Tris HCl (121,1 g Trizma base/1000 ml MQ, s pomočjo koncentrirane HCl korigiramo na pH 7,5). Za pripravo delovne raztopine 400 ml 1M Tris HCl zmešamo s 600 ml MQ.

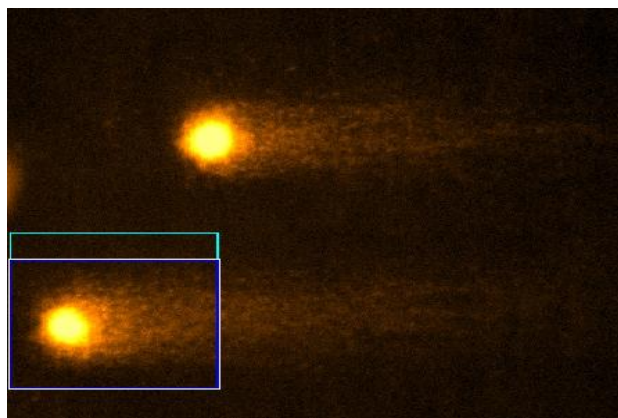
Barvanje jedrne DNA:

Za barvanje jedrne DNA smo uporabili raztopino EtBr (osnovna raztopina vsebuje 10 mg EtBr/ml). Za pripravo delovne raztopine potrebujemo 80 μ l osnovne raztopine v 400 mM Tris-HCl puftru (končna koncentracija 2 μ g/ml). Barvanje je potekalo 10 min v temi pri 4 °C. Po končanem barvanju smo gele 10 minut spirali v delovni raztopini Tris pufera.

3.2.3 Mikroskopska analiza

Poškodbe jedrne DNA smo ovrednotili z uporabo fluorescenčnega mikroskopa (Olympus CH 50, Japonska) pri 200-kratni povečavi, pri ekscitacijski svetlobi valovnih dolžin med 515 in 560 nm in emisijskem filtru 590 nm. Slike smo s pomočjo Hamamatsu Orca 2 kamere (Japonska) prenesli na računalniški ekran in s programom Komet 5 (Single Cell Gel Electrophoresis, Kinetic Imaging Ltd., 2000, VB) ovrednotili poškodbe jedrne DNA. Za ovrednotenje poškodb DNA smo ocenili 100 naključno

izbranih celičnih jeder za vsako žival. Ocene smo statistično ovrednotili s posebej v ta namen pripravljenimi makroji programa Microsoft Excel. Za ovrednotenje poškodb DNA smo uporabili dva parametra: % DNA v repu kometa in repni moment po Olivu (OTM). OTM (Olive, 1992), je izračunan kot razlika med centrom signala v repu in glavi, pomnožena z intenzivnostjo signala v repu deljena z intenzivnostjo celotnega signala. OTM nima enot, pri večjih vrednostih OTM so poškodbe DNA večje. Nekateri avtorji (Lee in sod., 2004) so mnenja, da je repni moment najboljši parameter za ocenjevanje poškodb DNA limfocitov.



Slika 9: Primer jedrne DNA limfocita, vidne pri mikroskopski analizi kometnega testa
Figure 9: The example of lymphocyte nuclear DNA seen by comet assay

3.3 ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA V MAŠČOBI TOPNIH SPOJIN (ACL)

Antioksidativno kapaciteto v maščobi topnih spojin smo merili v krvni plazmi z napravo PhotoChem (Analytic Jena, Jena, Nemčija). Pri tej metodi aparat generira nastanek superoksidnih anionov, ki jih nevtralizirajo antioksidanti v vzorcu, presežni superoksidni anioni reagirajo z luminolom, pri čemer se sprošča svetloba (kemiluminiscenca). Za kvantitativno določitev vsebnosti antioksidantov v vzorcu, se kot posledica te delne nevtralizacije uporablja inhibicija kemiluminiscenčnega signala. Antioksidativno kapaciteto v maščobi topnih spojin smo merili v krvni plazmi, pred samim merjenjem smo morali aparat umeriti s standardnimi raztopinami, za kar smo uporabili različne koncentracije troloxa (Analytic Jena, Jena, Nemčija). V plazmi smo pred samim merjenjem oborili beljakovine (v 1,5 ml Eppendorf epruvete smo odpipetirali 200 μ l plazme in 200 μ l metanola, dobro premešali na vrtinčniku in centrifugirali 10 minut pri $15000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pri analizi smo se držali navodil proizvajalca in uporabili reagente, ki so sestavni del kita.

3.4 ANTIOKSIDATIVNA MOČ REDUKCIJE ŽELEZA (FRAP)

Antioksidativno moč redukcije železa smo izmerili po postopku, ki sta ga opisala Benzie in Strain (1996). Za izvedbo potrebujemo naslednje kemikalije:

- 300 mmol acetatni pufer - 3,1 g $C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ in 16 ml očetne kisline (CH_3COOH) v 1 l MQ (pH = 3,6),
- 8 mmol TPTZ (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) (SIGMA T1253),
- 20 mmol železov klorid (Sigma F1513) - (540 mg $FeCl_3 \times 6 H_2O$ raztopimo v 100 ml MQ),
- FRAP raztopina: 25 ml acetatnega pufra, 2,5 ml TPTZ raztopine, 2,5 ml $FeCl_3 \times 6H_2O$,
- Standardna raztopina: 0,1 M $FeSO_4 \times 7H_2O$ (278 mg v 10 ml MQ).

Princip merjenja antioksidativne moči redukcije železa temelji na redukciji Fe^{3+} v Fe^{2+} ob prisotnosti antioksidanta. Nastali Fe^{2+} ioni ob prisotnosti TPTZ reagenta tvorijo obarvan kompleks, ki doseže absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 593 nm. Umeritveno krivuljo smo narisali na podlagi merjenja absorbance petih standardnih spojin (500, 250, 125, 62,5 in 31,25 μM) na spektrofotometru pri valovni dolžini 593 nm. Za merjenje FRAP smo v plastično kiveto odpipetirali 900 μl FRAP raztopine, pomerili absorbanco, nato dodali 100 μl vzorca, premešali in kinetiko merili 4,2 minute.

3.5 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Maščobnokislinsko sestavo smo določili v vzorcih prsne in stegenske mišice ter v jetrih. Analizo smo opravili po postopku, ki sta ga opisala Park in Goins (1994).

V postopku metilne estre maščobnih kislin po estrenju z metanolom in ekstrahiranju nastalih metilnih estrov v heksan, ločimo s pomočjo plinske kromatografije. Na ta način določimo maščobnokislinsko sestavo v vzorcu. Rezultat podamo kot masni delež posamezne maščobne kisline (md, g posamezne maščobne kisline/100 g vseh maščobnih kislin).

Vzorec smo zatehtali v epruvete z zamaškom, dodali 300 μl CH_2Cl_2 in 3 ml sveže pripravljene 0,5 M NaOH v metanolu. Epruvete smo prepicali z dušikom (tako smo preprečili oksidacijo s kisikom iz zraka). Vsebino smo dobro premešali in segrevali 10 min pri 90 °C v termičnem bloku. Po segrevanju smo jih hitro ohladili pod tekočo mrzlo vodo in vanje dodali 3 ml 12 % BF_3 v metanolu, ter ponovno prepicali z dušikom in segrevali v termičnem bloku 10 minut pri temperaturi 90 °C. Epruvete smo ponovno ohladili, nato vanje odpipetirali 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Metilne estre maščobnih kislin smo po stresanju in centrifugiranju (10 min 2000 $\times g$) ekstrahirali v nepolaro topilo. S Pasteurjevo pipeto smo heksansko plast prenesli v stekleničke, v

katerih smo vzorce hranili do analize. Pred esterifikacijo smo vzorcu dodali maščobno kislino C19:0 kot interni standard. Za ločitev metilnih estrov smo uporabili plinski kromatograf Agilent 6890 GC (Agilent, Santa Clara, ZDA), opremljen z avtomatskim podajalnikom in FID detektorjem (čas analize 54 min, volumen injiciranja 1 μ l). Uporabili smo kolono Omegawax 320 (30 m \times 0,32 mm i.d. \times 0.25 μ m, Supelco Bellefonte, ZDA).

3.6 KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA

Malondialdehid je končni produkt oksidacije VNMK v organizmu in potemtakem pokazatelj prisotnosti oksidacijskega stresa v organizmu, ki je posledica zauživanja večjih količin VNMK. Koncentracijo MDA smo določili v vzorcih krvne plazme, v jetrih ter v prsni in stegenski mišici. Malondialdehid v krvni plazmi smo določili po postopku, ki so ga opisali Wong in sod. (1987), spremenjenem po navodilih, ki so jih predlagali Chirico (1994) in Fukunaga in sod. (1995). Malondialdehid v mesu in jetrih smo analizirali po postopku, ki so ga opisali Vilà in sod. (2002).

Za analizo smo uporabili HPLC. Umeritveno krivuljo za določanje MDA-TBA2 kompleksa smo pripravili s standardi TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropan) v koncentracijskem območju, odvisnem od koncentracije MDA v vzorcih.

3.6.1 Malondialdehid v krvni plazmi

V 1,5 ml Eppendorf epruvete smo odpipetirali:

- 100 μ l 0,44 M raztopine H_3PO_4 ,
- 10 μ l 0,2 % raztopine BHT v absolutnem etanolu,
- 100 μ l plazme, standarda ali MQ (pri slepem vzorcu).

Pripravljene vzorce smo dobro premešali na vrtničniku, pustili stati 15 min in dodali 300 μ l absolutnega etanola. Vzorce smo dobro premešali in centrifugirali 15 minut pri 15000 $\times g$ in 4 $^{\circ}C$. Standardov in slepih vzorcev nismo centrifugirali. Po centrifugiranju smo v Hachove epruvete odpipetirali:

- 1,5 ml 0,44 M raztopine H_3PO_4 ,
- 350 μ l centrifugiranega vzorca,
- 500 μ l 0,6 % raztopine TBA in
- 900 μ l MQ.

Epruvete smo zaprli s teflonskim trakom in pokrovčki, premešali in za 60 minut postavili v grelni termostatski blok pri 95 $^{\circ}C$. Po segrevanju smo vzorce hitro ohladili v ledeni kopeli in prefiltrirali z uporabo 5 ml brizg in 0,2 μ m filtrov (GRACE, ZDA) v 2 ml vialo za avtomatski vzorčevalnik.

3.6.2 Malondialdehid v mišicah in jetrih

Vzorci mišic smo homogenizirali z Grindomixom GM200 (Retsch GmbH and Co., Haan, Nemčija). Vzorci jeter smo zmešali z MQ v razmerju 1:1 in jih homogenizirali s pomočjo naprave Ultraturax (Vibra, Slovenija). V 2 ml Eppendorf epruvete smo zatehtali 300 mg homogeniziranega vzorca (meso, jetra, MQ pri slepem vzorcu) in dodali 1,5 ml 2,5 % TCA. Mešanico smo dobro premešali na vrtničniku, pustili stati 10 min in nato centrifugirali 15 minut pri $15000 \times g$ in 4 °C. Standardov in slepih vzorcev nismo centrifugirali. Pri analizi MDA v stegenski mišici smo zaradi velike vsebnosti maščobe dodali 0,75 ml heksana, v katerem se je ta raztopila in jo po centrifugiranju odstranili. V Hachove epruvete smo nato odpipetirali:

- 1 ml centrifugiranega vzorca,
- 1 ml MQ,
- 1,5 ml 0,6 % raztopine TBA.

Postopek po centrifugiranju je enak kot pri analizi MDA v krvni plazmi.

Za določevanje MDA-TBA2 kompleksa smo uporabili HPLC, v ta namen smo uporabili aparat Waters Alliance 2690 in Waters 474 Scanning fluorescenčni detektor (ZDA). Rezultate smo ovrednotili s programsko opremo Millennium32 Chromatography Manager (Waters, ZDA). Za ločevanje smo uporabili kolono HyperClone 5 μ m ODS (C18) 120A, 4,6 x 150 mm; Phenomenex Inc., ZDA) in pripadajočo predkolono C18 ODS (4 mm x 3 mm; Phenomenex Inc., ZDA). Pri analizi vzorcev krvne plazme in jeter smo injicirali 50 μ l, pri analizi vzorcev mesa pa 20 μ l pripravljene raztopine. Retencijski čas kompleksa MDA-TBA2 je bil v povprečju 3,2 minute, za analizo enega vzorca smo potrebovali 6 min, pretok mobilne faze je znašal 1 ml/min. Kolona je bila na sobni temperaturi, vzorci v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz 65 % 50 mM KH_2PO_4 pufru (pH = 6,9) in 35 % metanola. pH pufru smo uravnali s pomočjo 1 M raztopine KOH. Da bi odstranili morebitne nečistoče, smo pufer prefiltrirali skozi filter z 0,45 μ m porami z uporabo vakuumske sesalne buče. Pred uporabo smo v mobilni fazi s pomočjo ultrazvočne kopeli odstranili zračne mehurčke.

3.7 ANALIZA VITAMINA E

Koncentracijo vitamina E smo določili v vzorcih plazme, jeter, prsne in stegenske mišice, trebušne maščobe, srca in možganov. Metodo, ki smo jo uporabili, so podrobneje opisali Abidi in Mounts (1997) in Rupérez in sod. (2001). Za določitev smo uporabili HPLC z uporabo kolone Luna 5u PFP(2) (100A 250 x 4.6 mm; Phenomenex Inc., Torrance, ZDA). Pri uporabi te kolone je možna tudi ločitev β - in γ -tokoferola. Mobilna faza je bila sestavljena iz 95 % metanola in 5 % MQ, pretok mobilne faze je bil 1,2 ml/min. Rezultate smo ovrednotili z računalniškim programom Millennium32

Chromatography Manager (Waters, Milford, ZDA). Za pripravo osnovnega standarda smo uporabili set tokoferolov (Tocopherol set 613424, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), s koncentracijo 0,5 g/l. Pripravili smo jih v heksanu, ki je vseboval 0,03 % BHT, da bi preprečili oksidacijo. Standarde smo hranili pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred samo analizo smo pripravili delovne standarde s koncentracijo 2,5 ppm za posamezen tokoferol.

3.7.1 Vitamin E v krvni plazmi

Analize smo opravljali v dveh ponovitvah za en vzorec. V Hachove epruvete smo odpipetirali 250 μl plazme, 250 μl MQ in 1,5 ml etanola, ki je vseboval 0,03 % BHT. Ko smo vsebino premešali, smo dodali 1,5 ml heksana in epruvete stresali 10 minut. Po centrifugiranju (10 minut, $5000 \times g$, sobna temperatura) smo 1 ml heksanske faze prenesli v čisto Hachovo epruveto in pod šibkim tokom dušika heksan odparili. Preostanek smo raztopili v 1 ml etanola, premešali in vzorce prenesli v vialo za HPLC avtomatski vzorčevalnik.

3.7.2 Vitamin E v tkivih

Vitamin E v vzorcih prsne in stegenske mišice, jeter in srca smo določevali po enakem postopku. Edina razlika je bila v načinu homogenizacije, saj smo vzorce mišic homogenizirali s pomočjo tekočega dušika v Grindomixu GM200 (Retsch GmbH and Co., Haan, Nemčija), vzorce jeter in srca pa smo zmešali z MQ v razmerju 1 : 1 in jih homogenizirali z Ultraturaxom (Vibra, Slovenija). V Hachove epruvete smo zatehtali približno 300 mg homogeniziranega vzorca, dodali 250 μl MQ in 2 ml etanola, ki je vseboval 0,03 % BHT. Vsebinsko smo premešali, dodali 2 ml heksana, stresali 10 minut in centrifugirali (10 minut, $5000 \times g$, sobna temperatura). Po centrifugiranju smo heksansko fazo prenesli v drugo epruveto, heksan odpihali pri šibkem toku dušika in dodali etanol, v katerem se je preostanek raztopil.

Za analizo vitamina E v maščobi smo 500 mg vzorca homogenizirali skupaj s heksanom (2,5 ml), nato 1 ml homogenata prenesli v Hachovo epruveto, dodali 0,5 ml etanola (z 0,03 % BHT), 0,5 ml MQ in 1,5 ml heksana. Vsebinsko smo premešali, stresali 10 minut in centrifugirali 15 minut pri $500 \times g$ in sobni temperaturi. En mililiter heksanske faze smo prenesli v drugo epruveto, prepahali z dušikom, in preostanek raztopili v 1,5 ml etanola ter prenesli v vialo za avtomatski vzorčevalnik.

Za določitev vitamina E v možganih, smo možgane stehtali, homogenizirali skupaj z 2 ml heksana, nato 0,5 ml homogenata prenesli v Hachovo epruveto, dodali 0,5 ml etanola (z 0,03 % BHT), 0,5 ml MQ in 1 ml heksana. Po stresanju in centrifugiranju (postopek je enak kot pri drugih tkivih), smo 1 ml heksanske faze prenesli v drugo epruveto,

prepihali z dušikom in preostanek raztopili v etanolu. Vzorce smo filtrirali z uporabo 5 ml brizg in 0,2 μ m filtrov (GRACE, Deerfield, ZDA) v 2 ml vialo z vstavljenim insertom (zaradi manjše količine vzorca) za avtomatski vzorčevalnik.

3.8 HOLESTEROL IN TRIGLICERIDI

Koncentracije skupnega holesterola in trigliceridov v plazmi smo določili z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX-Daytona z uporabo kita CH 3810 za analizo holesterola in kita TR 3823 za analizo trigliceridov v krvni plazmi.

3.9 ANALIZA JETRNEGA TRANSKRIPTOMA

3.9.1 Izolacija RNA iz jeter piščancev in analiza mikromrež

Vzorce jeter, odvzetih za izolacijo RNA, smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -70 °C. Vzorce smo uprašili s pomočjo Bessman Tissue Pulveriserja iz nerjavečega jekla (Spectrum Europe, Breda, Nizozemska). Uprašeni vzorec smo homogenizirali v TRIzol reagentu (T9424, Sigma-Aldrich, Seelze, Nemčija) s homogenizatorjem (Ultra-Turrax T8 homogenizer, IKA Labortechnik, Nemčija). Homogenizator smo po upraševanju vsakega vzorca očistili z MQ, ki je bila tretirana z DEPC, nato z 0,2 M NaOH, ponovno z DEPC vodo in na koncu s TRIzol reagentom. Po homogeniziranju smo vzorce prenesli v čiste Eppendorf epruvete jih centrifugirali (10 min, $12000 \times g$ pri 4 °C), nato smo supernatant prenesli v nove epruvete in dodali 300 μ l kloroforma. Mešanico smo 15 sekund stresali in jo nato inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce centrifugirali (15 min, $12000 \times g$ pri 4 °C). Vodno fazo smo odpipetirali v novo epruveto, dodali 700 μ l izopropanola, stresali 20 sekund in 10 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato ponovno centrifugirali (10 min, $12000 \times g$ pri 4 °C). Na koncu centrifugiranja smo supernatant zavrgli in preostanek ponovno centrifugirali (1 min, $12000 \times g$ pri 4 °C). Preostanek supernatanta smo zavrgli. Peletu, ki je ostal na dnu centrifugirke, smo dodali 1 ml 75 % EtOH-DEPC in nežno stresali 15 sekund. Na vrtničniku smo razbili pelet in ga centrifugirali (5 min, $7500 \times g$, 4 °C). Po centrifugiranju smo etanolni supernatant odlili, na kratko centrifugirali in odstranili še preostanek supernatanta ter vzorce pustili nekaj časa na zraku, da je odhlapel še morebitni preostanek etanola. RNA smo raztopili v 200 μ l H₂O-DEPC, tako da smo vzorce 10-15 minut inkubirali v termobloku na 65 °C. Vmes smo epruvete večkrat pretresli. Na koncu smo vzorce RNA ohladili na ledu in jih shranili pri -80 °C.

Z napravo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, ZDA) smo izmerili kvaliteto RNA oziroma določili t.i. integriteto RNA. RIN vrednosti za vzorce so bile med 8,9 in 9,3, kar kaže na visoko kakovost izolirane RNA.

Po štiri vzorce RNA iz vsake poskusne skupine smo naključno izbrali za analizo izražanja genov na čipih Affymetrix GeneChip® Chicken Genome Array (900592, Affymetrix, Santa Clara, ZDA). Pripravo RNA, hibridizacijo in branje podatkov so opravili na inštitutu Roslin v Edinburghu (Škotska) po standardnem protokolu Affymetrix-a (Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual). Normalizacijo podatkov in statistično analizo (ANOVA) smo opravili v programu Partek Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, ZDA). Za statistično značilno različne smo smatrali gene, pri katerih p-vrednost ni preseгла 0,05 in razmerje v izražanju gena med dvema skupinama ni bilo nižje od 1,2. Za nadaljnjo bioinformatično analizo smo seznam genov prenesli v program Ingenuity Pathways Analysis Software (Ingenuity Systems, Redwood City, ZDA) v katerem smo preučili razmerja, mehanizme delovanja, funkcije in presnovne poti, v katerih sodelujejo geni, ki so bili med skupinami različno izraženi.

3.9.2 Potrditev podatkov mikromrež (RT-qPCR)

Statistično značilne izražene gene med poskusnimi skupinami smo analizirali še z metodo RT-qPCR. Osredotočili smo se na različno izražene gene med skupinama Kont- in Kont+, ter gene, ki so bili različno izraženi pri skupinah α , γ in $\alpha+\gamma$ glede na Kont+. Za postopek smo uporabili RNA, ki smo jo izolirali iz jeter po zgoraj opisanem postopku. Za analizo RT-qPCR smo od skupne RNA odvzeli 1 μg vzorca, ki smo jo pomnožili s pomočjo DNAze I in obratno prepisali s SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kitom (Invitrogen). PCR v realnem času smo opravili na detekcijskem sistemu LightCycler 480 SYBR Green I Master upoštevajoč navodila proizvajalca (Roche, Mannheim, Nemčija). Za oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili programsko opremo Primer3 (Rozen in Skaletsky, 2000). PCR smo opravili po naslednjem postopku: pri 95 °C 10 minut, nato pri 95 °C 10 sekund, pri 60 °C 30 sekund, nato pri 72 °C 5 sekund v 38 ciklih s korakom disociacije pri 60 do 95 °C. Relativno izražena razmerja smo določili po postopku, ki so ga opisali Vandesompele in sod. (2002). Za interne referenčne gene smo uporabili stabilno izražene gene *RPL4*, *RPLP0*, *PPIB* in *EIF2A*. Seznam oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili v analizi PCR, je priložen v prilogi 1.

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA

3.10.1 Statistična obdelava fenotipskih podatkov

Za statistično obdelavo smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS 8e, 2000, ZDA). Normalnost porazdelitve podatkov smo testirali s proceduro UNIVARIATE, s proceduro MEANS smo izračunali statistične parametre. Za obdelavo podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduri GLM (General Linear Models) in

MIXED, kjer smo poleg sistematskih vključili tudi vpliv živali kot naključni vpliv. Razlike med skupinami smo ovrednotili s pomočjo linearnih kontrastov in Tukey-evega testa. Razlike smo smatrali za statistično značilne pri $P \leq 0,05$. Za statistično obdelavo smo uporabili različne modele. V najbolj enostaven model smo kot vpliv vključili vpliv skupine. Na ta način smo obdelali naslednje spremenljivke:

- Prirast
- Zauživanje krme
- Konverzija krme
- Podatki kometnega testa - OTM in % DNA v repu kometa
- Deleži maščobnih kislin v jetrih ter prsni in stegenski mišici
- MDA v krvni plazmi in jetrih
- Rezultati analiz FRAP in ACL
- Koncentracija holesterola in trigliceridov v krvni plazmi

Statistični model za našete spremenljivke:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij}$$

S_i = vpliv i-te skupine; $i = 1, 2, 3, 4, 5$

e_{ij} = ostanek

Ker smo koncentracijo MDA v prsni in stegenski mišici določili v vzorcih, ki so bili shranjeni na različne načine, smo v model poleg vpliva skupine vključili tudi vpliv načina shranjevanja (sveži, shranjeni 6 dni v hladilniku pri 4 °C, shranjeni 2 ali 4 mesece v zamrzovalniku pri -20 °C) in interakcijo med obema vplivoma.

Statistični model za koncentracijo MDA v prsni in stegenski mišici:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + SH_{ij} + a_k + e_{ijkl}$$

S_i = vpliv i-te skupine; $i = 1, 2, 3, 4, 5$

H_j = vpliv j-tega načina shranjevanja; $j = 1, 2, 3, 4$

SH_{ij} = interakcija med S_i in H_j

a_k = vpliv živali

e_{ijkl} = ostanek

Koncentracijo α - in γ -tokoferola smo izmerili v krvni plazmi in različnih tkivih (jetra, srce, prsna in stegenska mišica, abdominalna maščoba, možgani), zato smo poleg vpliva skupine v model vključili tudi vpliv tkiva in interakcijo med njima.

Statistični model za koncentracijo α - in γ -tokoferola v krvni plazmi in različnih tkivih

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + T_j + ST_{ij} + a_k + e_{ijkl}$$

S_i = vpliv i-te skupine; $i = 1, 2, 3, 4, 5$

T_j = vpliv j-tega tkiva; $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$

ST_{ij} = interakcija med S_i in T_j

a_k = vpliv živali

e_{ijkl} = ostanek

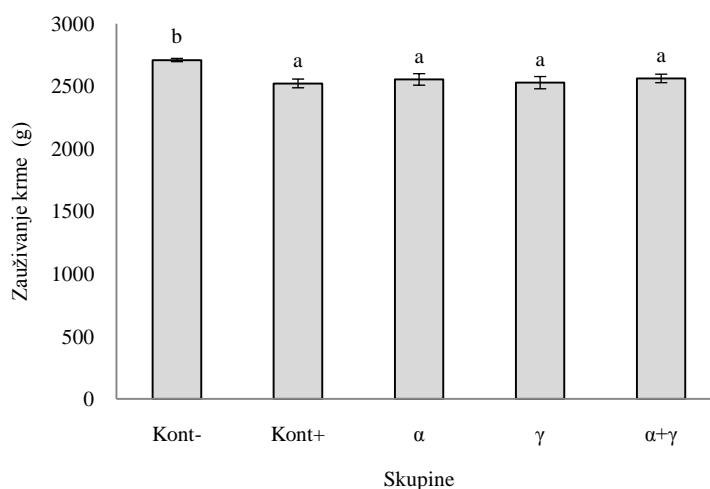
3.10.2 Statistična obdelava podatkov pridobljenih z analizo mikromrež

Za statistično analizo podatkov, ki smo jih pridobili z analizo mikromrež, smo uporabili proceduro ANOVA, s pomočjo katere smo opravili normalizacijo in statistično analizo podatkov. Za to smo uporabili program Partek Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, ZDA). Za statistično značilno izražene smo smatrali gene, ki so bili med skupinami vsaj 1,2-krat različno izraženi pri $P \leq 0,05$. Za nadaljnjo bioinformatično analizo smo podatke naložili v program Ingenuity Pathways Analysis Software (Ingenuity Systems, Redwood City, ZDA), v katerem smo preučili povezave, mehanizme, funkcije in presnovne poti, v katerih sodelujejo geni, ki so bili med skupinami različni izraženi. Pri analizi smo se osredotočili na razlike med obema kontrolnima skupinama (Kont+ v primerjavi s Kont-) in na razlike med skupinami, ki so prejemale dodatek obeh tokoferolov in njuno kombinacijo v primerjavi s pozitivno kontrolno skupino (α , γ in $\alpha+\gamma$ v primerjavi s Kont+).

4 REZULTATI

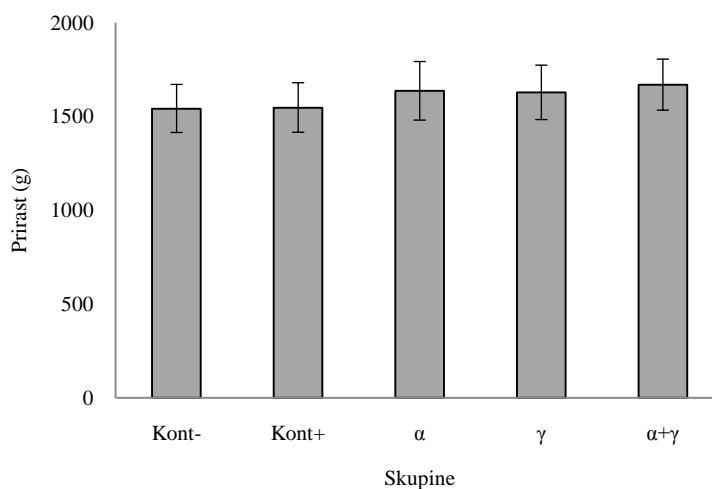
4.1 PROIZVODNI REZULTATI

Piščanci so bili tekom poskusa zdravi, pogina nismo zabeležili. Skupina, ki je prejela palmino mast, je zaužila večje količine krme (slika 10), razlik v prirastu med različnimi skupinami ni bilo (slika 11). Posledično je bila konverzija krme pri skupini Kont- slabša (slika 12).

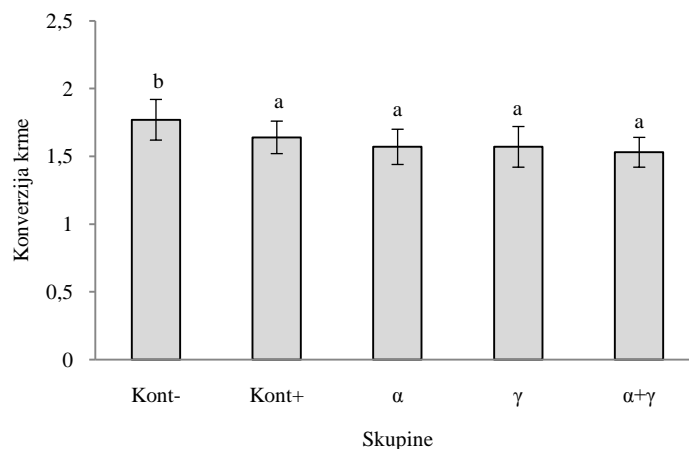


^{ab} - stolpci, označeni z različnimi črkami se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Slika 10: Zauživanje krme pri piščancih po poskusnih skupinah
Figure 10: Chicken feed consumption among treatment groups



Slika 11: Prirast pri piščancih po poskusnih skupinah
Figure 11: Chicken weight gain among treatment groups



^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Slika 12: Konverzija krme pri piščancih po poskusnih skupinah
Figure 12: Feed consumption ratio among treatment groups

4.2 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA PRSNE IN STEGENSKE MIŠICE TER JETER

Največji vpliv na razlike v maščobnokislinski sestavi prsne in stegenske mišice ter jeter je imelo krmljenje različnih virov maščob, na kar kaže primerjava skupin Kont- in Kont+ (Pregl. 7, 8, 9). Negativna kontrolna skupina (Kont-) je kot dodatek prejela palmino mast, katere sestava se je odražala v sestavi maščobe v tkivih. Deleži NMK in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK) so bili pri tej skupini večji kot pri vseh ostalih skupinah. Te so prejemale dodatek lanenega olja, zato je bil delež VNMK v teh skupinah večji. Razlik med skupinami, ki so prejemale laneno olje, ni bilo, razen pri deležu dolgoverižnih VNMK (C20:5 n-3 – EPA in C22:6 n-3 – DHA) v stegenski mišici. Deleža teh dveh maščobnih kislin sta bila pri skupini, ki je prejela 67 mg/kg γ -tokoferola v primerjavi s pozitivno kontrolno skupino večja (Pregl. 8).

Preglednica 7: Maščobnokislinska sestava prsne mišice (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)

Table 7: Breast muscle fatty acid composition (wt, g of each fatty acid/100 g of all fatty acids)

	Kont-	Kont+	α	γ	$\alpha+\gamma$	p-vrednost	SEM
C18:1 n-9	34,79 ^b	26,10 ^a	25,96 ^a	24,49 ^a	25,77 ^a	<0,001	0,64
C18:2 n-6	12,62 ^a	15,49 ^b	15,25 ^b	14,82 ^b	15,22 ^b	<0,001	0,35
C18:3 n-3	0,62 ^a	13,89 ^b	13,38 ^b	12,56 ^b	13,64 ^b	<0,001	0,92
C20:4 n-6	3,11 ^b	1,65 ^a	1,78 ^a	1,95 ^a	1,82 ^a	<0,001	0,18
C20:5 n-3	0,49 ^a	2,49 ^b	2,61 ^b	3,07 ^b	2,64 ^b	<0,001	0,20
C20:6 n-3	0,64 ^a	1,26 ^b	1,38 ^b	1,53 ^b	1,30 ^b	<0,001	0,10
NMK	36,96 ^b	29,92 ^a	30,11 ^a	31,05 ^a	30,04 ^a	<0,001	0,66
ENMK	42,18 ^b	30,09 ^a	30,02 ^a	28,49 ^a	29,89 ^a	<0,001	0,76
VNMK	20,86 ^a	39,57 ^b	40,16 ^b	40,46 ^b	40,08 ^b	<0,001	0,59
n-3 VNMK	2,24 ^a	21,50 ^b	21,34 ^b	22,02 ^b	21,61 ^b	<0,001	0,48
n-6 VNMK	18,58	18,47	18,51	18,43	18,45	0,995	0,51
n-6/n-3	8,33 ^b	0,87 ^a	0,87 ^a	0,84 ^a	0,86 ^a	<0,001	0,09
DV VNMK	7,40 ^a	10,37 ^b	11,72 ^b	12,87 ^b	10,97 ^b	<0,001	0,75
n-6 DV VNMK	5,79 ^b	2,90 ^a	3,40 ^a	3,55 ^a	3,15 ^a	<0,001	0,29
n-3 DV VNMK	1,61 ^a	7,47 ^b	7,81 ^b	9,32 ^b	7,82 ^b	<0,001	0,56
DV n-6/n-3	3,60 ^b	0,39 ^a	0,41 ^a	0,38 ^a	0,40 ^a	<0,001	0,03
ps	0,57 ^a	1,34 ^b	1,33 ^b	1,31 ^b	1,34 ^b	<0,001	0,04

MK – maščobne kisline, NMK - nasičene MK, ENMK - enkrat nenasičene MK, VNMK – večkrat nenasičene MK, DV – dolgoverižne, ps – peroksidno število

^{ab} – lsmean vrednosti, označene z različnimi črkami se znotraj vrstic razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Preglednica 8: Maščobnokislinska sestava stegenske mišice (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)

Table 8: Thigh muscle fatty acid composition (wt, g of each fatty acid/100 g of all fatty acids)

	Kont-	Kont+	α	γ	$\alpha+\gamma$	p-vrednost	SEM
C18:1 n-9	39,04 ^b	30,49 ^a	30,03 ^a	28,93 ^a	30,11 ^a	<0,001	0,55
C18:2 n-6	10,02 ^a	15,35 ^b	15,41 ^b	15,92 ^b	15,52 ^b	<0,001	0,32
C18:3 n-3	0,75 ^a	21,39 ^b	21,87 ^b	21,99 ^b	21,62 ^b	<0,001	0,38
C20:4 n-6	0,912 ^b	0,364 ^a	0,402 ^a	0,453 ^a	0,452 ^a	<0,001	0,059
C20:5 n-3	0,10 ^a	0,55 ^b	0,56 ^{bc}	0,70 ^c	0,67 ^{bc}	<0,001	0,04
C20:6 n-3	0,11 ^a	0,24 ^b	0,32 ^{bc}	0,39 ^c	0,28 ^{bc}	<0,001	0,03
NMK	38,98 ^a	25,04 ^b	24,62 ^b	25,10 ^b	24,55 ^b	<0,001	0,46
ENMK	48,20 ^b	35,69 ^a	35,34 ^a	33,75 ^a	35,26 ^a	<0,001	0,71
VNMK	12,57 ^a	39,27 ^b	40,04 ^b	41,16 ^b	40,19 ^b	<0,001	0,74
n-3 VNMK	1,11 ^a	23,13 ^b	23,84 ^b	24,29 ^b	23,73 ^b	<0,001	0,43
n-6 VNMK	11,40 ^a	16,08 ^b	16,14 ^b	16,82 ^b	16,41 ^b	<0,001	0,36
n-6/n-3	10,41 ^a	0,70 ^b	0,68 ^b	0,69 ^b	0,69 ^b	<0,001	0,07
DV VNMK	1,69 ^a	2,21 ^{ab}	2,28 ^{ab}	2,91 ^b	2,71 ^b	<0,001	0,17
n-6 DV VNMK	1,39 ^c	0,66 ^a	0,67 ^a	0,82 ^b	0,81 ^b	0,004	0,07
n-3 DV VNMK	0,29 ^a	1,47 ^b	1,61 ^{bc}	2,09 ^c	1,90 ^{bc}	<0,001	0,12
DV n-6/n-3	4,66 ^b	0,43 ^a	0,42 ^a	0,39 ^a	0,43 ^a	<0,001	0,13
ps	0,33 ^a	1,57 ^b	1,63 ^b	1,65 ^b	1,64 ^b	<0,001	0,05

MK – maščobne kisline, NMK - nasičene MK, ENMK - enkrat nenasičene MK, VNMK – večkrat nenasičene MK, DV – dolgoverižne, ps – peroksidno število

^{ab} – lsmean vrednosti, označene z različnimi črkami se znotraj vrstic razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Preglednica 9: Maščobnokislinska sestava jeter (md, g posamezne MK/100g vseh maščobnih kislin)

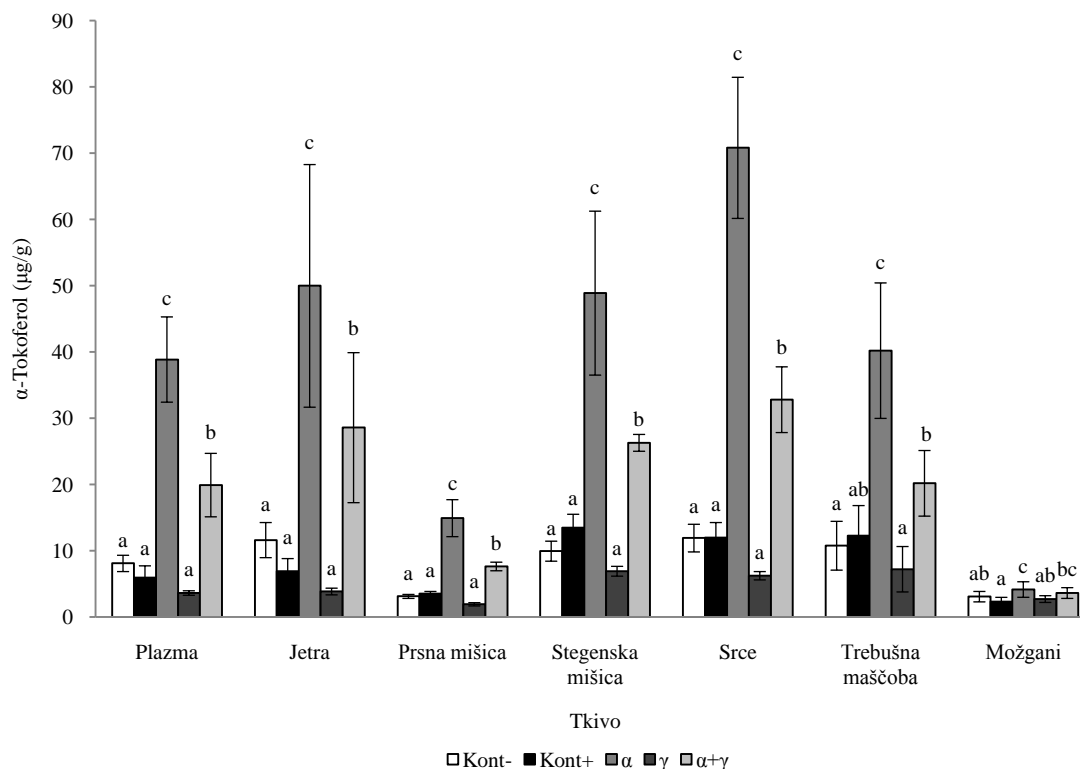
Table 9: Liver fatty acid composition (wt, g of each fatty acid/100 g of all fatty acids)

	Kont-	Kont+	α	γ	$\alpha+\gamma$	p-vrednost	SEM
C18:1 n-9	24,45 ^b	14,60 ^a	18,95 ^a	17,19 ^a	18,51 ^a	0,021	2,21
C18:2 n-6	16,36	16,89	15,19	15,97	15,42	0,573	0,89
C18:3 n-3	0,38 ^b	7,80 ^a	8,11 ^a	6,91 ^a	6,27 ^a	<0,001	0,77
C20:4 n-6	8,98 ^b	3,69 ^a	3,34 ^a	3,65 ^a	3,50 ^a	<0,001	0,55
C20:5 n-3	0,01 ^a	0,48 ^b	0,37 ^b	0,43 ^b	0,40 ^b	<0,001	0,59
C20:6 n-3	1,78 ^a	4,93 ^b	4,04 ^b	4,56 ^b	4,28 ^b	<0,001	0,40
NMK	39,40 ^b	37,00 ^a	36,61 ^a	37,26 ^a	38,05 ^{ab}	0,004	0,64
ENMK	28,69 ^b	16,63 ^a	21,45 ^a	19,66 ^a	21,04 ^a	<0,001	1,87
VNMK	31,91 ^a	46,36 ^b	41,94 ^b	43,08 ^b	40,91 ^b	<0,001	1,86
n-3 VNMK	3,65 ^a	24,09 ^b	22,11 ^b	21,93 ^b	20,54 ^b	<0,001	1,04
n-6 VNMK	28,21 ^b	22,25 ^a	19,80 ^a	21,12 ^a	20,34 ^a	<0,001	1,05
n-6/n-3	8,08 ^b	0,93 ^a	0,90 ^a	0,98 ^a	1,00 ^a	<0,001	0,27
DV VNMK	14,71 ^a	21,41 ^b	18,35 ^{ab}	19,94 ^b	18,98 ^{ab}	0,003	1,38
n-6 DV VNMK	11,50 ^b	5,28 ^a	4,53 ^a	5,07 ^a	4,85 ^a	<0,001	0,54
n-3 DV VNMK	3,22 ^a	16,14 ^b	13,82 ^b	14,88 ^b	14,14 ^b	<0,001	0,97
DV n-6/n-3	3,69 ^b	0,33 ^a	0,33 ^a	0,35 ^a	0,35 ^a	<0,001	0,10

MK – maščobne kisline, NMK - nasičene MK, ENMK - enkrat nenasičene MK, VNMK – večkrat nenasičene MK, DV – dolgoverižne

^{ab} – lsmean vrednosti, označene z različnimi črkami se znotraj vrstic razlikujejo pri $P \leq 0,05$

4.3 VITAMIN E V KRVNI PLAZMI IN TKIVIH



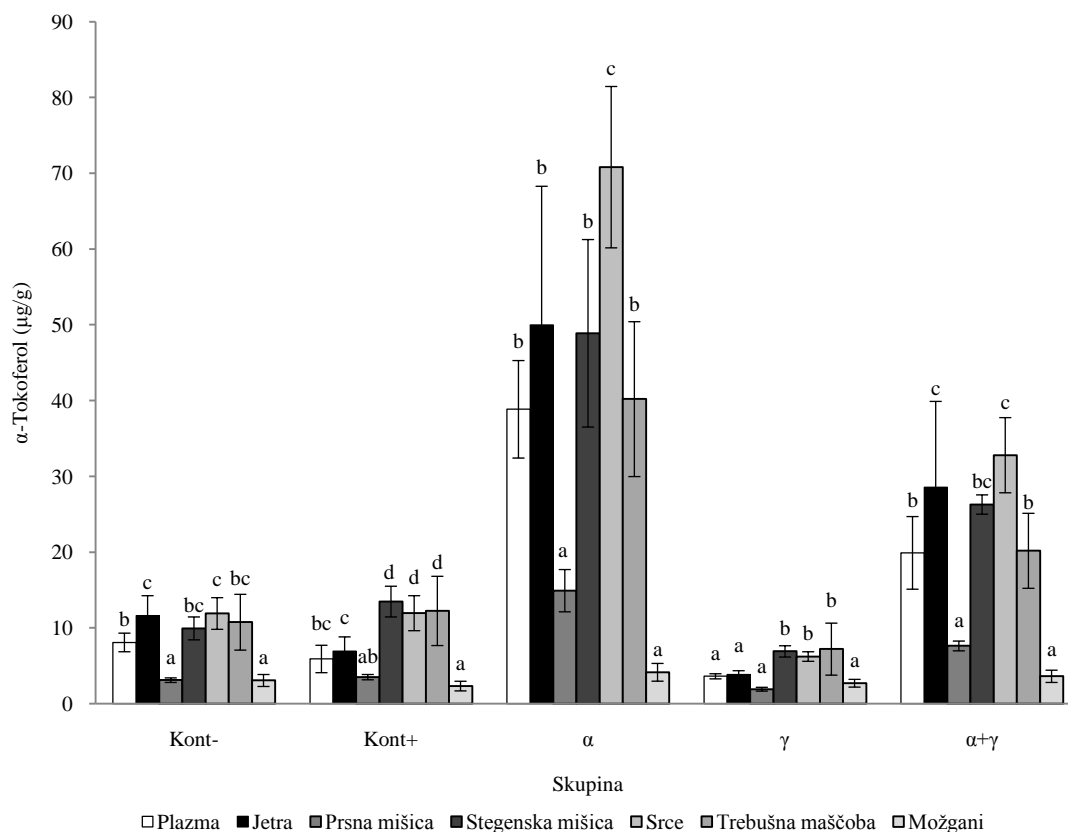
^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posameznega tkiva pri $P \leq 0,05$

Slika 13: Koncentracija α -tokoferola v krvni plazmi in tkivih med poskusnimi skupinami
Figure 13: Plasma and tissue α -tocopherol concentration among treatment groups

Koncentracijo vitamina E smo merili v krvni plazmi in različnih tkivih: jetrih, prsni in stegenski mišici, srcu, trebušni maščobi in možganih. Na ločenih slikah so prikazane razlike v koncentraciji α - in γ -tokoferola med posameznimi poskusnimi skupinami (sliki 13 in 15) in med posameznimi tkivi (sliki 14 in 16). Pri metodi, ki smo jo uporabili za analizo koncentracije vitamina E, se sicer analizira tudi koncentracijo β - in δ -tokoferola, vendar so bile vsebnosti teh dveh oblik pod mejo detekcije, zato rezultati niso prikazani.

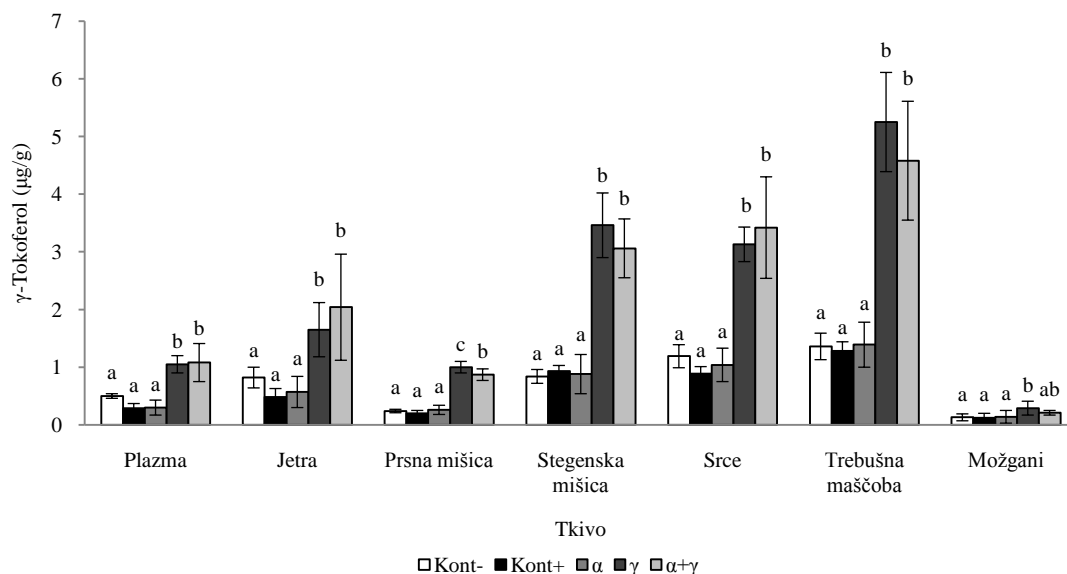
Koncentracija α -tokoferola v plazmi in v tkivih se je povečevala v skladu s povečevanjem vsebnosti α -tokoferola v krmi (slika 13). Največjo koncentracijo smo izmerili v skupini α , sledila je skupina $\alpha+\gamma$, koncentracija v obeh kontrolnih skupinah in v skupini, ki je prejela samo γ -tokoferol, je bila majhna. Razlike v koncentraciji α -tokoferola med posameznimi tkivi so bile velike (slika 14). Če se osredotočimo na skupino, ki je prejela največjo količino α -tokoferola (α), lahko vidimo, da je bila koncentracija α -tokoferola največja v srčni mišici, sledijo jetra, stegenska mišica,

trebušna maščoba in krvna plazma. Najmanj α -tokoferola smo določili v prsni mišici in v možganih. Podobne razlike lahko opazimo pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov. Razlike v koncentraciji α -tokoferola v skupini γ in v obeh kontrolnih skupinah so bile majhne, trend je bil podoben kot pri skupinah α in $\alpha+\gamma$ (slika 14).



^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posamezne skupine pri $P \leq 0,05$

Slika 14: Koncentracija α -tokoferola v krvni plazmi in tkivih znotraj posamezne poskusne skupine
 Figure 14: α -Tocopherol concentration in plasma and tissues within each treatment group

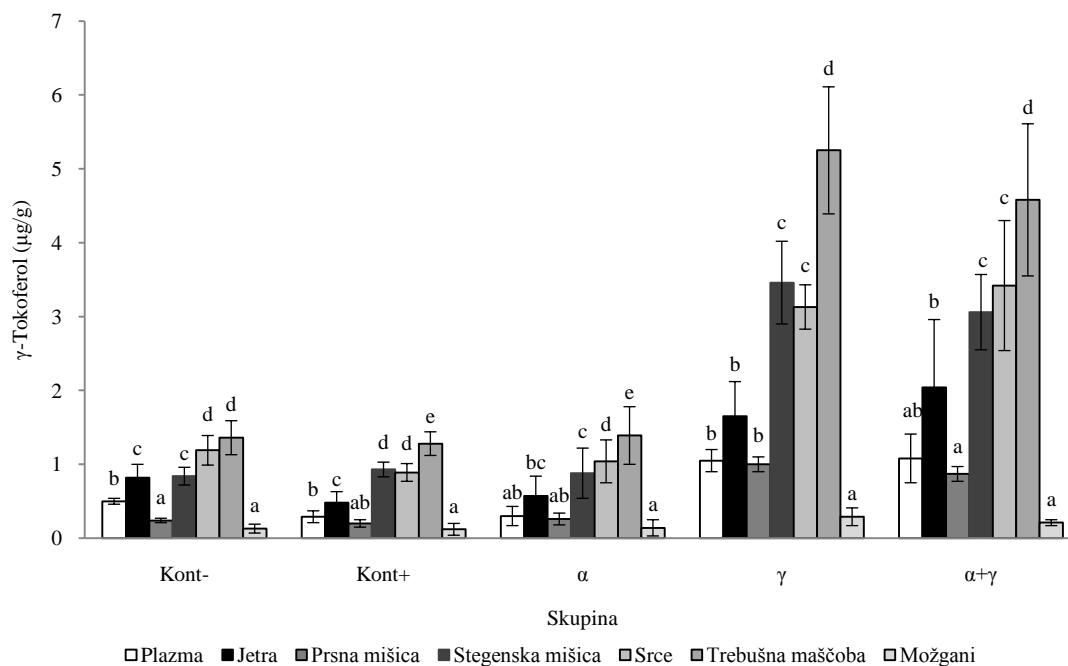


abc - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posameznega tkiva pri $P \leq 0,05$

Slika 15: Koncentracija γ -tokoferola med poskusnimi skupinami v krvni plazmi in tkivih
 Figure 15: γ -Tocopherol concentration among treatment groups in plasma and tissues

Koncentracija γ -tokoferola tako v plazmi kot v tkivih je bila v primerjavi z α -tokoferolom majhna (slika 15). Največje koncentracije smo določili v obeh skupinah, ki sta prejemale dodatek γ -tokoferola, med njima razen v prsni mišici ni bilo razlik (slika 15). Koncentracije v ostalih treh skupinah so bile manjše, med seboj se niso razlikovale. Kar se tiče razlik med posameznimi tkivi, je bila koncentracija največja v trebušni maščobi, nekoliko manjša v srčni in stegenski mišici, sledita plazma in jetra ter prsna mišica pri skupini γ , najmanjše vsebnosti so bile v možganih (slika 16).

Pri testiranju modela za koncentracijo obeh tokoferolov v plazmi in tkivih smo uporabili proceduro za testiranje mešanega modela (PROC MIXED), pri čemer smo upoštevali vpliv skupine, tkiva in interakcijo med tema vplivoma kot sistematske vplive in vpliv živali kot naključni vpliv. Pri obeh oblikah tokoferolov so bili vsi sistematski vplivi statistično značilni (Pregl. 10).



^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posamezne skupine pri $P \leq 0,05$

Slika 16: Koncentracija γ -tokoferola v krvni plazmi in tkivih znotraj posamezne poskusne skupine

Figure 16: γ -Tocopherol concentration in plasma and tissues within each treatment group

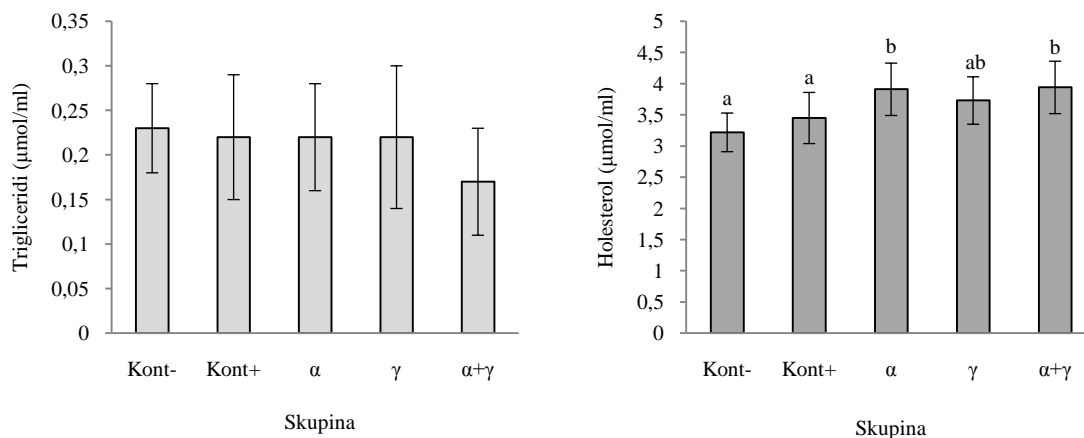
Preglednica 10: Statistični parametri pri ovrednotenju vplivov na koncentracijo vitamina E v plazmi in tkivih

Table 10: Statistical parameters at the evaluation of effects on vitamin E concentration in plasma and tissues

	α -tokoferol	γ -tokoferol
P-vrednost – skupina	<0,001	<0,001
P-vrednost – tkivo	<0,001	<0,001
P-vrednost – skupina*tkivo	<0,001	<0,001
SEM	2,11	0,13

*SEM – standardna napaka povprečja

4.4 PLAZEMSKI HOLESTEROL IN TRIGLICERIDI



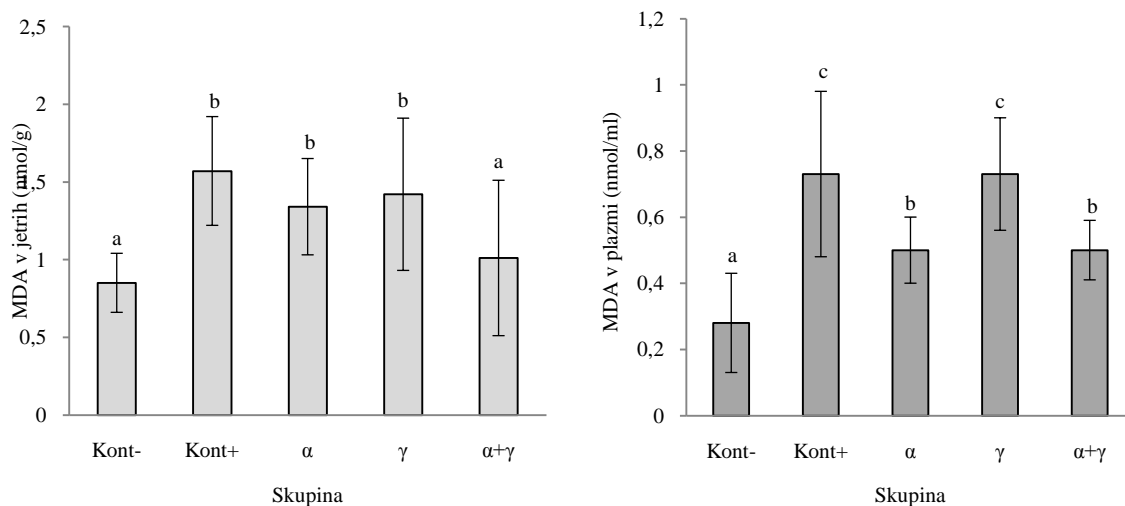
^{ab} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Slika 17: Koncentracija skupnega holesterola in trigliceridov v plazmi
Figure 17: Plasma total cholesterol and triglyceride concentration

Krmljenje različnih virov maščobe ni vplivalo na koncentracijo holesterola in trigliceridov v krvni plazmi (slika 17), saj med kontrolnima skupinama nismo opazili razlik. Koncentracija trigliceridov je ostala nespremenjena tudi pri vseh treh skupinah, ki so prejemale α - ali γ -tokoferol ter njuno kombinacijo, povečano koncentracijo plazemskega holesterola smo izmerili pri skupinah α in $\alpha+\gamma$.

4.5 POKAZATELJI OKSIDACIJSKEGA STRESA *in vivo*

4.5.1 Malondialdehid



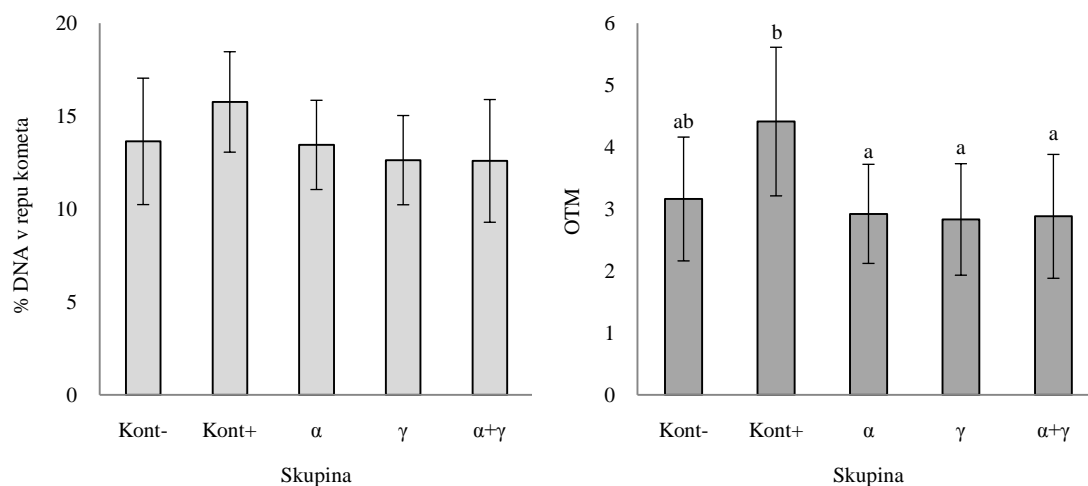
abc - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

Slika 18: Koncentracija malondialdehida (MDA) v jetrih in krvni plazmi
Figure 18: Liver and plasma malondialdehyde (MDA) concentration

Zaradi zauživanja krme z dodanim lanenim oljem (Kont+) se je povečal obseg lipidne oksidacije v organizmu. Koncentracije MDA so bile večje v skupini Kont+ kot v Kont- (slika 18). Zaradi dodatka 67 mg/kg α -tokoferola in kombinacije α - in γ -tokoferola v krmo se je koncentracija MDA v plazmi zmanjšala, vendar ne na popolnoma isto raven kot pri skupini Kont-. Dodatek samo γ -tokoferola ni vplival na zmanjšanje MDA v krvni plazmi. V jetrih se je vsebnost MDA zmanjšala samo pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov (slika 18). Pri tej skupini je bila koncentracija MDA enaka kot pri negativni kontrolni skupini.

4.5.2 Poškodbe DNA limfocitov

Rezultati kometnega testa so predstavljeni kot delež DNA v repu kometa in kot OTM. Ta je izračunan kot razlika med centrom v repu kometa in centrom v glavi kometa, ki je pomnožena z intenzivnostjo signala v repu, vse skupaj deljeno z intenzivnostjo celotnega kometa (Olive, 1992). Delež DNA v repu kometa se med skupinami ni razlikoval, medtem ko je bil OTM pri vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek tokoferolov manjši, kar nakazuje na manjše poškodbe DNA pri teh treh skupinah. Med kontrolnima skupinama tudi pri OTM ni bilo razlik (slika 19).

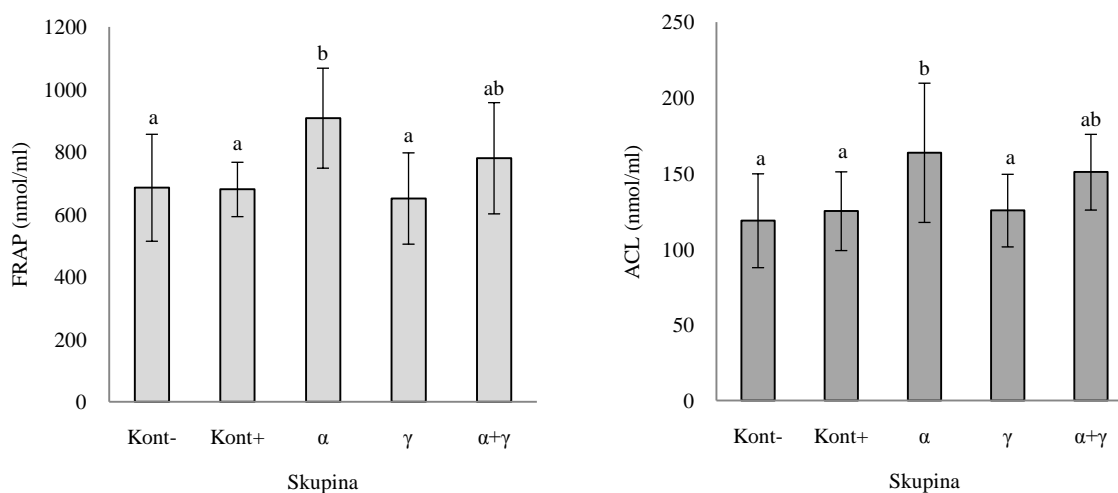


^{ab} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

*OTM - repni moment po Olivu, definiran kot razlika med centrom v repu in centrom v glavi kometa, pomnoženo z intenzivnostjo signala v repu in vse skupaj deljeno z intenzivnostjo celotnega kometa (Olive in sod., 1992)

Slika 19: Poškodbe DNA limfocitov, predstavljene kot delež DNA v repu kometa in OTM
Figure 19: Lymphocyte DNA damage presented as percentage of tail DNA and OTM

4.5.3 Antioksidativna kapaciteta krvne plazme



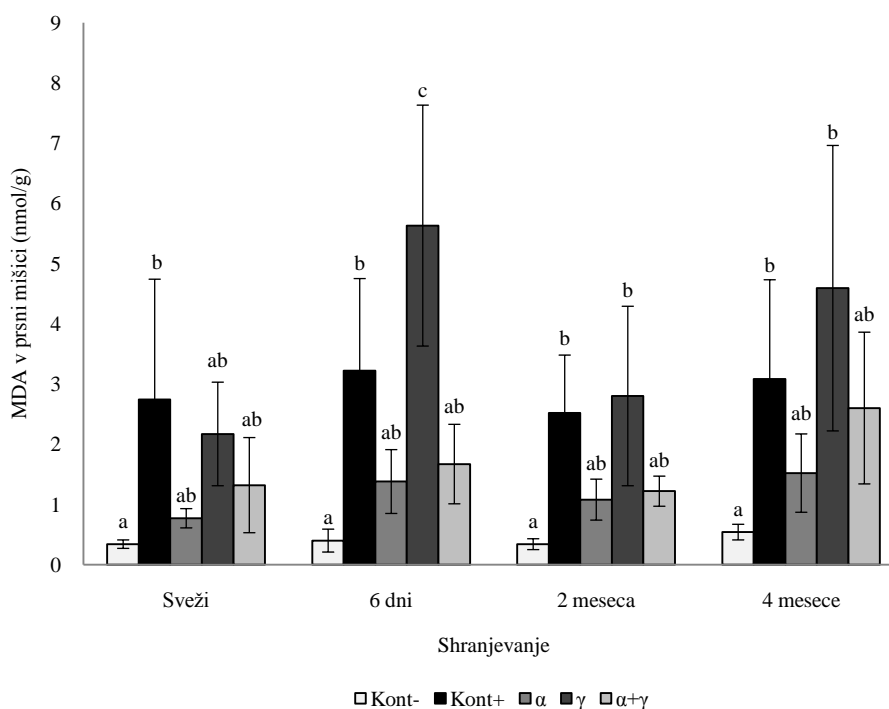
^{ab} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo pri $P \leq 0,05$

* FRAP – antioksidativna moč redukcije železa (nmol FeSO_4/ml), ACL – antioksidativna kapaciteta v maščobi topnih spojin (ekvivalenti troloksa)

Slika 20: Antioksidativna kapaciteta krvne plazme merjena kot FRAP in ACL
Figure 20: Antioxidative capacity of blood plasma measured as FRAP and ACL

Antioksidativna kapaciteta v maščobni topnih antioksidantov se med kontrolnima skupinama ni razlikovala. Zaradi dodatka 67 mg/kg α -tokoferola v krmo se je povečala antioksidativna kapaciteta merjena kot ACL, saj je bila antioksidativna kapaciteta v maščobi topnih spojin v skupini α največja, sledila je skupina $\alpha+\gamma$, medtem ko se pri skupini γ ACL ni povečala (slika 20). Isti trend smo zasledili pri metodi FRAP (slika 20).

4.6 LIPIDNA OKSIDACIJA V PRSNI IN STEGENSKI MIŠICI



abc - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posameznega načina shranjevanja pri $P \leq 0,05$

*6 dni – shranjeni 6 dni v hladilniku, 2 meseca – shranjeni 2 meseca pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 mesece – shranjeni 4 mesece pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

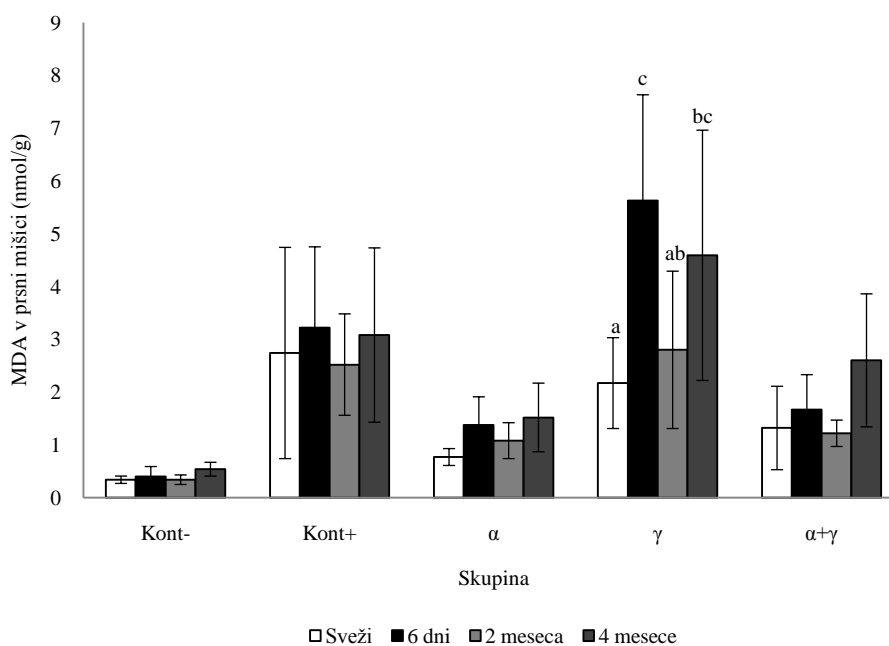
Slika 21: Koncentracija malondialdehida (MDA) v prsni mišici shranjeni na različne načine – razlike med skupinami

Figure 21: Malondialdehyde (MDA) concentration in breast muscle stored under different conditions – differences among groups

Koncentracijo MDA v prsni in stegenski mišici smo določili v vzorcih, ki so bili shranjeni pri različnih pogojih, in sicer v svežih vzorcih, vzorcih, ki so bili shranjeni 6 dni v hladilniku ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), ter dva in štiri mesece v zamrzovalniku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pri statistični obdelavi smo v statistični model vključili skupino in način shranjevanja. Za lažji prikaz rezultatov so na ločenih slikah prikazane razlike med posameznimi poskusnimi

skupinami in med posameznimi načini shranjevanja. Statistične značilnosti za posamezne vplive so predstavljene posebej v preglednici 11.

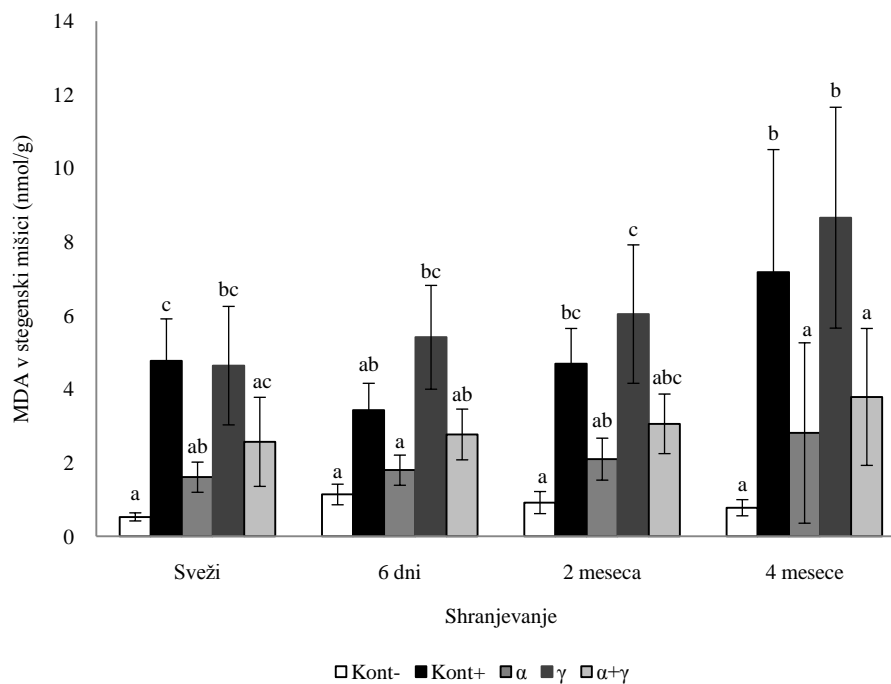
Zaradi krmljenja lanenega olja se je tako v prsni kot v stegenski mišici pri vseh pogojih shranjevanja povečal obseg oksidacije maščob. To lahko trdimo na podlagi večjih koncentracij MDA pri Kont+ v primerjavi s Kont- (sliki 21 in 23). V večini primerov je dodatek 67 mg/kg α -tokoferola zmanjšal nastajanje MDA v prsni (slika 21) in stegenski mišici (slika 23), v nasprotju z γ -tokoferolom. Pri tej skupini dodatek iste količine γ -tokoferola razen v sveži prsni mišici ni bil učinkovit. Kombinacija obeh oblik je zmanjšala nastajanje MDA, vendar ne do take mere kot se je to pokazalo pri skupini α (sliki 21 in 23). Shranjevanje je vplivalo na povečano oksidacijo maščobe pri vzorcih prsne mišice iz skupine γ , ki so bili shranjeni 6 dni v hladilniku in 2 meseca v zamrzovalniku (slika 22), in pri vzorcih stegenske mišice shranjenih 4 mesece v zamrzovalniku pri skupinah Kont+ in α (slika 24). Interakcija med načinom shranjevanja in skupino je bila značilna v prsni mišici (Pregl. 11).



^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posamezne skupine pri $P \leq 0,05$
*6 dni – shranjeni 6 dni v hladilniku, 2 meseca – shranjeni 2 meseca pri -20°C , 4 mesece – shranjeni 4 mesece pri -20°C

Slika 22: Koncentracija malondialdehida (MDA) v prsni mišici shranjeni na različne načine – razlike po pogojih shranjevanja

Figure 22: Malondialdehyde (MDA) concentration in breast muscle stored under different conditions – differences among storage conditions

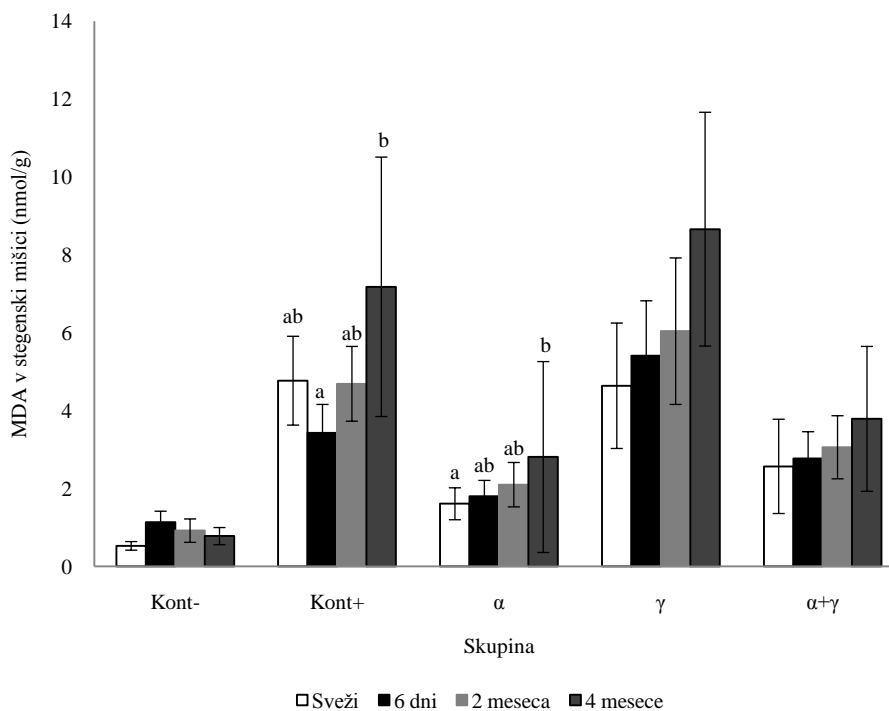


^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posameznega načina shranjevanja pri $P \leq 0,05$

*6 dni – shranjeni 6 dni v hladilniku, 2 meseca – shranjeni 2 meseca pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 mesece – shranjeni 4 mesece pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Slika 23: Koncentracija malondialdehida (MDA) v stegenski mišici shranjeni na različne načine – razlike med skupinami

Figure 23: Malondialdehyde (MDA) concentration in thigh muscle stored under different conditions – differences among groups



^{abc} - stolpci, označeni z različnimi črkami, se razlikujejo znotraj posamezne skupine pri $P \leq 0,05$
 *6 dni – shranjeni 6 dni v hladilniku, 2 meseca – shranjeni 2 meseca pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 mesece – shranjeni 4 mesece pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Slika 24: Koncentracija malondialdehida (MDA) v stegenski mišici shranjeni na različne načine – razlike po pogojih shranjevanja

Figure 24: Malondialdehyde (MDA) concentration in thigh muscle stored under different conditions – differences among storage conditions

Preglednica 11: Statistični parametri pri ovrednotenju vplivov na koncentracijo malondialdehida v prsni in stegenski mišici shranjenih na različne načine

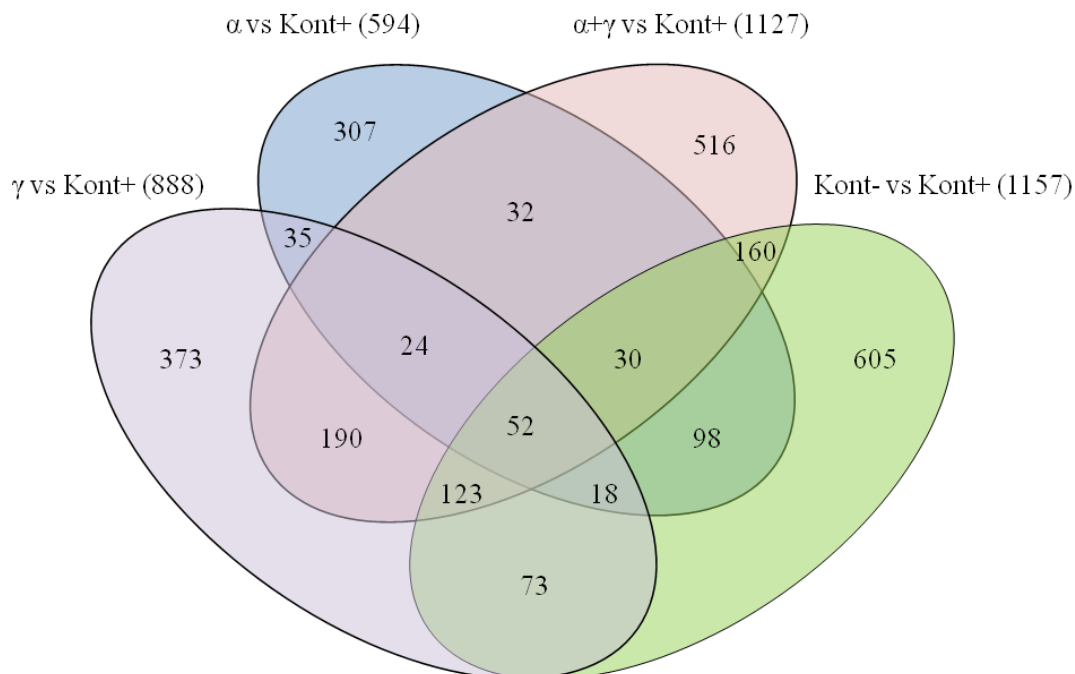
Table 11: Statistical parameters for the evaluation of effects on malondialdehyde concentration in breast and thigh muscle stored under different conditions

	Prsa	Stegno
P-vrednost – skupina	<0,01	<0,01
P-vrednost – shranjevanje	<0,01	<0,01
P-vrednost – skupina*shranjevanje	<0,01	0,09
SEM	0,68	0,48

4.7 ANALIZA JETRNEGA TRANSKRIPTOMA

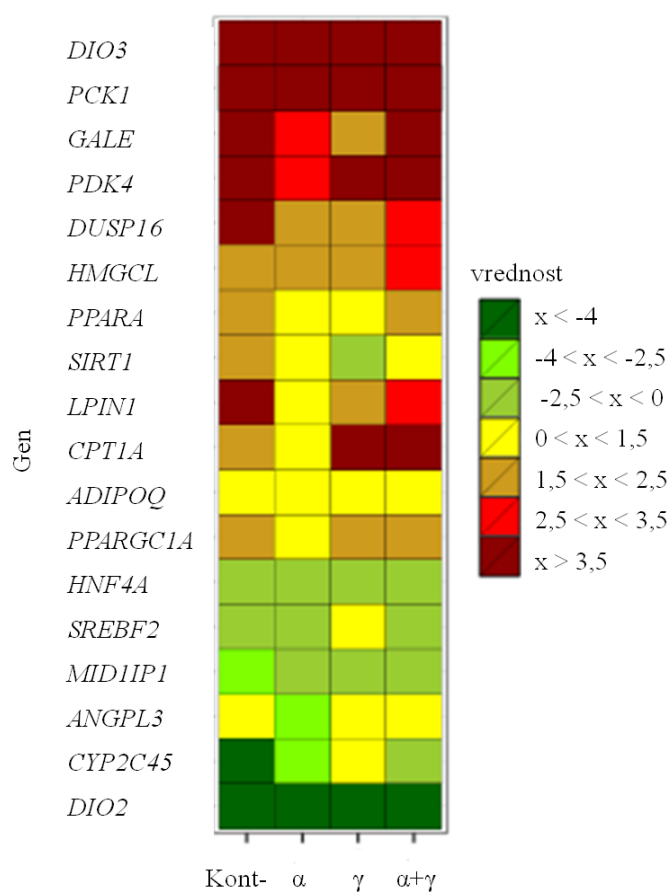
Rezultati analize mikromrež so pokazali veliko število različno izraženih genov med posameznimi poskusnimi skupinami, osredotočili smo se na razlike med skupinama Kont+ in Kont- in na razlike med skupinami, ki so prejele dodatek vitamina E v primerjavi s pozitivno kontrolo (α proti Kont+, γ proti Kont+ in $\alpha+\gamma$ proti Kont+). Za ločeno primerjavo smo se odločili, ker na razlike v izražanju genov med kontrolnima skupinama vpliva predvsem krmljenje različnih virov maščobe (laneno olje v primerjavi s palmino mastjo), na razlike v izražanju genov med pozitivno kontrolno skupino in skupinami, ki so prejele različne oblike vitamina E, pa delovanje tega vitamina.

Ko smo primerjali skupini Kont- in Kont+ je bilo različno izraženih 1157 anotiranih genov. Upoštevali smo gene, pri katerih je bila razlika v izražanju statistično značilna ($P \leq 0,05$) in večja od 1,2. Pri presnovnih poteh, v katerih je bilo značilno izraženo več genov, smo obravnavali tudi tiste, katerih statistična značilnost je bila nekoliko manjša. Pri teh genih je P-vrednost podana dodatno. Pri primerjavi skupin α in Kont+ je bilo različno izraženih 594 genov. Pri primerjavi skupin γ in Kont+ je bilo različno izraženih 888, pri primerjavi skupin $\alpha+\gamma$ in Kont+ pa 1127 genov. Vennov diagram na sliki 25 prikazuje število genov, ki so bili med skupinami različno izraženi. Dvainpetdeset genov je takih, ki so bili značilno različno izraženi pri vseh štirih primerjavah skupin.



Slika 25: Vennov diagram, ki prikazuje število različno izraženih genov med poskusnimi skupinami
Figure 25: Venn diagram of genes differentially expressed among experimental groups

Ko smo primerjali gene, ki so bili različno izraženi med skupinama Kont+ in Kont-, smo ugotovili, da so različno izraženi predvsem geni, ki sodelujejo pri presnovi maščob (slika 26, Pregl. 12) in holesterola (slika 27, Pregl. 12), ter geni, ki so povezani z oksidacijskim stresom (slika 28, Pregl. 12). Ker so te presnovne poti najbolj zanimive glede na zasnovo raziskave, smo se pri razpravi osredotočili na njihovo obravnavo. V preglednici 12 in toplotnih grafih so tako predstavljeni geni, ki so bili različno izraženi pri analizi mikromrež, za gene, ki smo jih analizirali s pomočjo RT-qPCR, so v preglednici 12 podane tudi razlike in statistične značilnosti dobljene pri tej analizi. Čeprav je pri RT-qPCR statistična značilnost za nekatere gene nekoliko manjša, lahko opazimo podobne smernice v izražanju teh genov pri obeh vrstah analize.

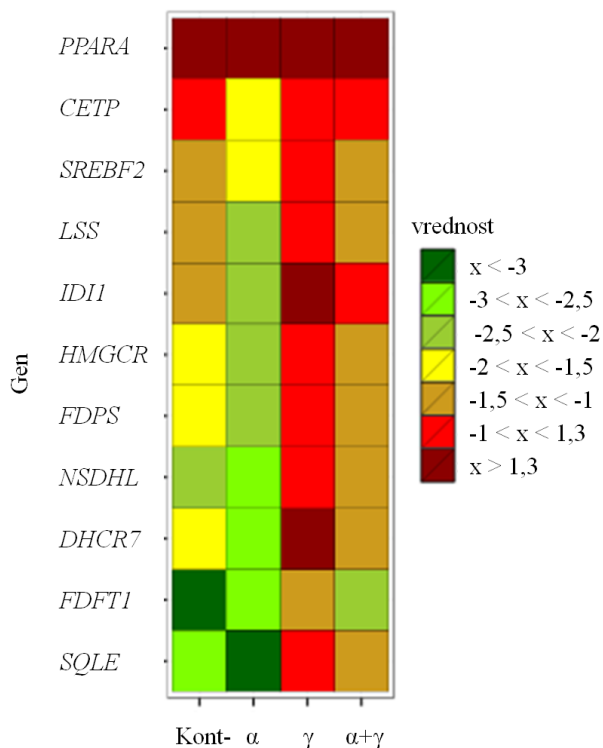


Slika 26: Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v presnovo maščob v primerjavi s Kont+

Figure 26: Heat map showing differentially expressed genes involved in fat metabolism relative to Kont+

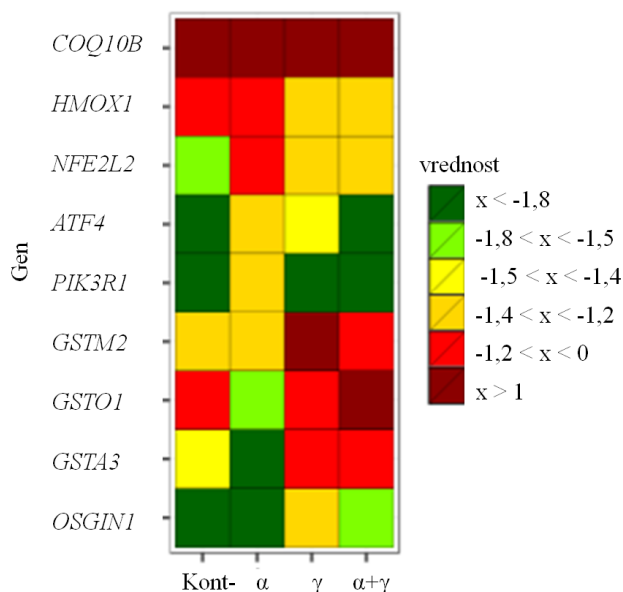
Statistična značilnost rezultatov pri RT-qPCR je bila nekoliko slabša tudi pri genih, ki so bili različno izraženi, ko smo primerjali skupine, ki so dobivale dodatek vitamina E (α , γ in $\alpha+\gamma$) v primerjavi s Kont+. Kljub temu je raven izraženosti primerljiva s tisto, ki smo jo dobili pri analizi mikromrež. Pri primerjavi teh skupin s pozitivno kontrolno skupino smo ugotovili, da je različno izraženih precej genov, ki so vpletene v presnovo

maščob (slika 26, Pregl. 13, 14, 15). Pri skupini α je bilo znižano izraženo kar nekaj genov, ki so vpleteni v biosintezo holesterola (slika 27, Pregl. 13), medtem ko pri skupinah γ in $\alpha+\gamma$ takega vpliva nismo ugotovili. Pri vseh treh skupinah je bilo različno izraženo tudi nekaj genov, ki so povezani z oksidacijskim stresom (slika 28, Pregl. 13, 14, 15), v skupinah γ in $\alpha+\gamma$ tudi tistih, ki so povezani z vnetnimi procesi in imunostjo (slika 29, Pregl. 14, 15).



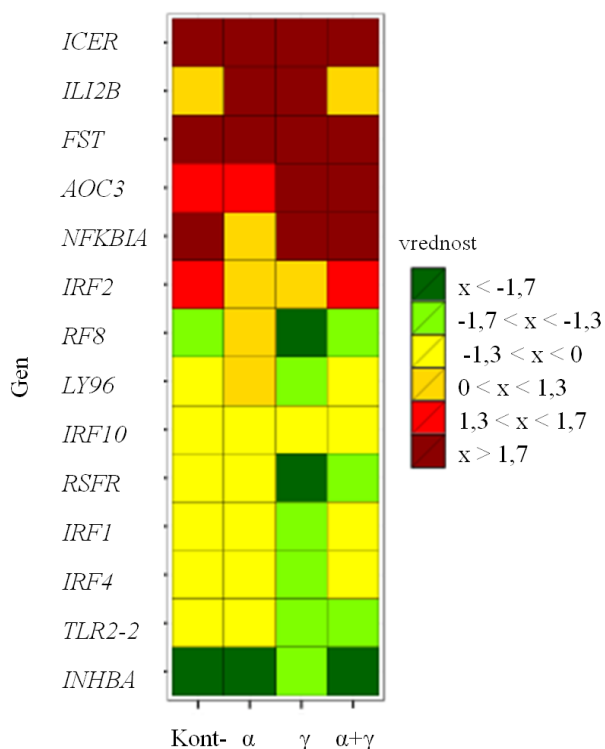
Slika 27: Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v presnovo holesterola v primerjavi s Kont+

Figure 27: Heat map showing differentially expressed genes involved in cholesterol metabolism relative to Kont+



Slika 28: Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, vpletene v regulacijo oksidacijskega stresa v primerjavi s Kont+

Figure 28: Heat map showing differentially expressed genes involved in regulation of oxidative stress relative to Kont+



Slika 29: Toplotni graf, ki prikazuje različno izražene gene, povezane z vnetnimi procesi in imunostjo v primerjavi s Kont+

Figure 29: Heat map showing differentially expressed genes involved in regulation of oxidative stress relative to Kont+

Preglednica 12: Razlike v izražanju genov med skupinama Kont+ in Kont-
 Table 12: Differences in gene expression between groups Kont+ and Kont-

Gen - simbol	Razlika v izražanju – mikromreže	Razlika v izražanju –RT-qPCR*
Geni vpleteni v presnovo maščob		
<i>DIO3</i>	-20,03	-16,88 (P=0,09)
<i>CYP2C45</i>	10,01	18,03 (P=0,11)
<i>DIO2</i>	8,80	
<i>PCK1</i>	-7,11	
<i>LPIN1</i>	-4,30	
<i>PDK4</i>	-4,28	-4,15 (P=0,03)
<i>GALE</i>	-4,12	-6,17 (P=0,08)
<i>DUSP16</i>	-3,52	-2,46 (P=0,02)
<i>HNF4A</i>	3,15	2,02 (P=0,26)
<i>MID1IP1</i>	2,64	
<i>HMGCL</i>	-2,48	-2,15 (P=0,19)
<i>PPARGCIA</i>	1,64	
<i>PPARA</i>	-1,58	-1,37 (P=0,20)
<i>SREBF2</i>	1,40 (P=0,07)	
Geni vpleteni v presnovo holesterola		
<i>SIK1</i>	-4,82	-4,64 (P=0,05)
<i>FDFT1</i>	4,43	5,92 (P=0,17)
<i>HMGCR</i>	1,82	
Geni povezani z oksidacijskim stresom		
<i>OSGIN1</i>	4,32	3,76 (P=0,01)
<i>COQ10B</i>	-3,02	-2,91 (P=0,03)
<i>ATF4</i>	2,00	
<i>NFE2L2</i>	1,73	
<i>PIK3R1</i>	1,86	1,72 (P=0,06)

* samo za gene potrjene z RT-qPCR

Preglednica 13: Razlike v izražanju genov med skupinama α in Kont+
 Table 13: Differences in gene expression between groups α and Kont+

Gen - simbol	Razlika v izražanju – mikromreže	Razlika v izražanju – RT-qPCR*
Geni vpleteni v presnovo maščob		
<i>DIO3</i>	4,70	4,10 (P=0,10)
<i>PCK1</i>	4,65	
<i>DIO2</i>	-4,15 (P=0,07)	
<i>GALE</i>	3,30	4,10 (P=0,06)
<i>CYP2C45</i>	-3,23	-3,52 (P=0,22)
<i>PDK4</i>	3,20	2,30 (P=0,04)
<i>ANGPTL3</i>	-2,56	
<i>DUSP16</i>	2,24	1,30 (P=0,55)
<i>HNF4A</i>	-1,90	-1,59 (P=0,43)
<i>MID1IP1</i>	-1,85 (P=0,07)	
<i>HMGCL</i>	1,85	2,3 (P=0,21)
<i>SREBF2</i>	-1,74	
<i>PPARA</i>	1,72	1,12 (P=0,45)
<i>SIRT1</i>	1,45	
<i>ADIPOQ</i>	1,35	
Geni vpleteni v presnovo holesterola		
<i>SIK1</i>	4,13	3,1 (P<0,01)
<i>SQLE</i>	-3,75	
<i>FDFT1</i>	-2,92	-4,02 (P=0,21)
<i>DHCR7</i>	-2,64	
<i>NSDHL</i>	-2,60	
<i>FDPS</i>	-2,43	
<i>HMGCR</i>	-2,38	
<i>ID11</i>	-2,28	
<i>LSS</i>	-2,23	
<i>SCP2</i>	1,89	
<i>CETP</i>	-1,53	
Geni povezani z oksidacijskim stresom		
<i>GSTA3</i>	-1,93	
<i>COQ10B</i>	1,75	1,5 (P=0,35)
<i>GSTO1</i>	-1,39	
<i>GSTM2</i>	-1,38	
<i>PIK3R1</i>	-1,36 (P=0,07)	-1,5 (P=0,09)
Geni, povezani z vnetnimi procesi in imunostjo		
<i>ICER</i>	2,93	
<i>IL12B</i>	2,11	

* samo za gene potrjene z RT-qPCR

Preglednica 14: Razlike v izražanju genov med skupinama γ in Kont+
Table 14: Differences in gene expression between groups γ and Kont+

Gen - simbol	Razlika v izražanju – mikromreže	Razlika v izražanju – RT-qPCR*
Geni vpleteni v presnovo maščob		
<i>DIO3</i>	6,78	4,88 (P=0,24)
<i>CPT1A</i>	5,99	1,01 (P=0,97)
<i>PCK1</i>	5,79	
<i>DIO2</i>	-5,37	
<i>PDK4</i>	3,80	3,30 (P=0,10)
<i>DUSP16</i>	2,37	1,88 (P=0,07)
<i>GALE</i>	2,20 (P=0,09)	1,70 (P=0,25)
<i>HMGCL</i>	1,98	1,41 (P=0,37)
<i>MIDI1P1</i>	-1,88 (P=0,08)	
<i>PPARGC1A</i>	1,53	
<i>PPARA</i>	1,51	1,12 (P=0,45)
<i>HNF4A</i>	-1,37	-1,71 (P=0,34)
<i>ADIPOQ</i>	1,31 (P=0,06)	
Geni vpleteni v presnovo holesterola		
<i>SIK1</i>	2,46 (P=0,08)	2,91 (P=0,32)
Geni, povezani z oksidacijskim stresom		
<i>COQ10B</i>	2,93	2,66 (P=0,03)
<i>PIK3R1</i>	-1,83	-1,93 (P=0,02)
<i>GSTO1</i>	1,40	
<i>HMOX1</i>	-1,30	
Geni, povezani z vnetnimi procesi in imunostjo		
<i>FST</i>	2,91	2,63 (P=0,08)
<i>ICER</i>	2,89	
<i>NFKBIA</i>	2,64	
<i>AOC3</i>	1,91	
<i>IL12B</i>	1,86	
<i>RSFR</i>	-1,76	-2,20 (P=0,10)
<i>IRF8</i>	-1,76	
<i>INHBA</i>	-1,65 (P=0,09)	
<i>TLR2-2</i>	-1,61	
<i>LY96</i>	-1,57	
<i>IRF1</i>	-1,35	
<i>IRF4</i>	-1,32	
<i>IRF10</i>	-1,28	
<i>IRF2</i>	1,22	

* samo za gene potrjene z RT-qPCR

Preglednica 15: Razlike v izražanju genov med skupinama $\alpha+\gamma$ in Kont+
Table 15: Differences in gene expression between groups $\alpha+\gamma$ and Kont+

Gen - simbol	Razlika v izražanju – mikromreže	Razlika v izražanju – RT-qPCR*
Geni vpleteni v presnovo maščob		
<i>DIO3</i>	10,63	7,61 (P=0,03)
<i>PCK1</i>	8,90	
<i>DIO2</i>	-6,63	
<i>PDK4</i>	4,63	3,64 (P<0,01)
<i>CPT1A</i>	3,97	1,08 (P=0,82)
<i>GALE</i>	3,72	3,17 (P<0,01)
<i>DUSP16</i>	2,92	2,26 (P=0,02)
<i>HMGCL</i>	2,51	1,89 (P=0,08)
<i>PPARGC1A</i>	1,96	
<i>MID1IP1</i>	-1,87 (P=0,07)	
<i>ADIPOQ</i>	1,41	
<i>PPARA</i>	1,58	1,10 (P=0,51)
<i>HNF4A</i>	-1,30	-2,90 (P=0,14)
Geni vpleteni v presnovo holesterola		
<i>SIK1</i>	3,00	2,56 (P=0,04)
Geni, povezani z oksidacijskim stresom		
<i>COQ10B</i>	3,24	2,64 (P=0,01)
<i>ATF4</i>	-2,00	
<i>PIK3R1</i>	-1,88	-1,95 (P=0,02)
<i>NFE2L2</i>	-1,53	
<i>HMOX1</i>	-1,28	
Geni, povezani z vnetnimi procesi in imunostjo		
<i>NFKBIA</i>	3,81	
<i>ICER</i>	3,74	
<i>FST</i>	3,46	3,11 (P<0,01)
<i>AOC3</i>	2,04	
<i>INHBA</i>	-1,87	
<i>IRF8</i>	-1,54 (P=0,09)	
<i>RSFR</i>	-1,47 (P=0,06)	-1,78 (P=0,18)
<i>TLR2-2</i>	-1,38 (P=0,06)	
<i>IRF2</i>	1,34	
<i>IRF10</i>	-1,22	

* samo za gene potrjene z RT-qPCR

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV RAZLIČNIH VIROV MAŠČOBE TER α - IN γ -TOKOFEROLA NA OKSIDACIJSKI STRES V ORGANIZMU

Piščanci pitanci so v intenzivnih pogojih reje pogosto izpostavljeni oksidacijskemu stresu. Ta je lahko posledica delovanja zunanjih dejavnikov ali različnih bolezenskih stanj, oksidacijski stres se pogosto pojavi tudi zaradi zauživanja krme, ki vsebuje velik delež VNMK. Dodajanje n-3 VNMK se uporablja z namenom pridobivanja funkcionalne hrane, saj tako meso vsebuje večji delež esencialnih maščobnih kislin, ki jih v prehrani človeka primanjkuje. Kot povzeto v preglednem članku A. P. Simopoulos (1999) so maščobne kisline s tremi nenasičenimi vezmi nujno potrebne za normalno rast in razvoj in igrajo pomembno vlogo pri preprečevanju in zdravljenju srčno-žilnih bolezni, visokega krvnega tlaka, sladkorne bolezni in ostalih vnetnih in avtoimunskih bolezni. Prehrana v zahodnem svetu je bogata predvsem z n-6 VNMK, tako da znaša razmerje med njimi in n-3 VNMK celo 20 do 30 : 1, kar gre pripisati predvsem manjšemu zauživanju rib in krmljenju živali z industrijsko pripravljeno krmo, ki vsebuje velike količine n-6 VNMK. Zaradi zauživanja velikih količin n-6 VNMK se tvorijo predvsem eikozanoidi in njihovi presnovni produkti (prostaglandini, levkotrieni, tromboksani, hidroksi maščobne kisline, lipoksini) iz arahidonske kisline (C20:4 n-6). Ti v primeru, ko je njihova tvorba prevelika, povzročajo nastanek strdkov in ateromov ter vodijo v razvoj alergijskih in vnetnih stanj. V nasprotju imajo n-3 VNMK ugodne učinke na preprečevanje bolezni. n-3 in n-6 VNMK imajo tako nasprotujoče si lastnosti, saj iz njih nastajajo različni eikozanoidi. Krmljenje n-6 VNMK modelnim živalim je na primer povzročilo nastajanje tumorjev, medtem ko je krmljenje iste količine n-3 VNMK preprečilo njihovo tvorbo (Duplus in sod., 2000).

Večina raziskav je sicer preučevala učinke maščobnih kislin, ki se nahajajo v ribjem olju (EPA in DHA). Ti dve maščobni kislini se v procesih elongacije in desaturacije tvorita iz α -linolenske kisline (C18:3 n-3), ta se nahaja predvsem v zelenih listih in lanenem, repičnem in orehovem olju. V prehrani je pomembno predvsem razmerje med zaužitimi maščobnimi kislinami z n-6 oziroma n-3 nenasičenimi vezmi, ki naj bi bilo po priporočilih avtorice 1-4:1 (Simopoulos, 1991). Ker n-3 VNMK vsebujejo tri nenasičene vezi med ogljikovimi atomi, so bolj dovzetne za poškodbe zaradi delovanja oksidantov. Zato se v krmo dodaja vitamin E, ki je eden najpomembnejših antioksidantov, ki preprečuje vzpostavitev verižne reakcije lipidne peroksidacije. V krmo se dodajajo velike količine vitamina E v obliki α -tokoferola. Ker veliko krmil, ki se uporabljajo v prehrani perutnine vsebuje velike količine γ -tokoferola, smo se odločili za raziskavo, v kateri smo primerjali učinek slednjega v primerjavi z α -tokoferolom, hkrati pa preučevali kako deluje kombinacija obeh oblik.

Malondialdehid je spojina, ki se pogosto uporablja za določanje lipidne oksidacije v organizmu, saj nastaja kot sekundarni produkt oksidacije VNMK v organizmu (Vossen in sod., 2011). Tudi v naši raziskavi smo ugotovili, da krmljenje lanenega olja, bogatega z VNMK povečuje nastajanje MDA. Koncentracije MDA v plazmi, jetrih in mišicah so bile v skupini, ki je prejela laneno olje, večje kot v skupini, ki je prejela palmino mast. Tudi razlike v maščobnokislinski sestavi jeter in mišic med kontrolnima skupinama so v skladu s prejšnjimi raziskavami, v katerih so ugotovili, da se maščobnokislinska sestava krme odraža v maščobnokislinski sestavi tkiv (An in sod., 1997; Nam in sod., 1997; Narciso-Gatyán in sod., 2010). Delež naloženih dolgoveržnih n-3 maščobnih kislin (EPA in DHA) je bil večji v prsni kot v stegenski mišici, kar so ugotovili že O'Keefe in sod. (1995), ki so poudarili, da zaradi večje celokupne vsebnosti teh maščobnih kislin v stegnu, prsna mišica ni nujno tudi večji vir le-teh, saj je potrebno upoštevati vsebnost maščob, ki je po navadi večja v stegenski mišici. Pri merjenju antioksidacijske kapacitete krvne plazme med kontrolnima skupinama v naši raziskavi ni bilo razlik, saj sta obe prejeli minimalno količino vitamina E, ki zadošča le za pokritje osnovnih potreb (NRC, 1994), nikakor pa ne zadošča za pokritje vseh potreb piščancev, ki so izpostavljeni intenzivnim pogojem reje. V naši raziskavi sicer ni prišlo do razlik v prirastu med poskusnimi skupinami, prav tako so bile živali zdrave. V skupini, ki je kot vir maščobe prejela palmino mast, je bilo zauživanje krme večje, posledično je bilo izkoriščanje krme pri tej skupini slabše. Lauridsen in sod. (1997) so ugotovili, da je absorpcija NMK manjša kot absorpcija VNMK, kar je najverjetneje tudi vzrok za slabšo konverzijo pri piščancih, ki so prejeli palmino mast.

Kometni test je preprosta metoda, s katero merimo poškodbe DNA (Duthie in sod., 2002). Poškodovana DNA se pri elektroforezi razvije, pri tem nastane tako imenovan rep, ki skupaj z nepoškodovano DNA tvori videz kometa. V samem protokolu minigele izpostavimo fluorescentnemu barvilu, komete nato zaznamo s pomočjo fluorescentnega mikroskopa (Olive in sod., 1990).

Limfociti, ki jih izoliramo iz krvi, služijo kot priročen material, ki se že dolgo uporablja za preučevanje poškodb DNA in zmožnost njihovega popravljanja v humanih poskusi (Duthie in sod., 2002), naše predhodne raziskave (Pajk in sod., 2006; Frankič in sod., 2008; Voljč in sod., 2011) so pokazale njihovo uporabnost tudi v živalskih raziskavah. Zaradi krmljenja lanenega olja je prišlo do povečanja poškodb DNA v primerjavi s kontrolnimi skupinami (Voljč in sod., 2011), ki so prejemale vir NMK. V naši raziskavi razlika v stopnji poškodb DNA med skupinama, ki sta prejemale krmo z različno vrsto maščobe (palmina mast v primerjavi z lanenim oljem) sicer ni bila statistično značilna, je pa bil OTM v skupini Kont- manjši, kar kaže na manjšo stopnjo poškodb DNA pri piščancih iz te skupine.

Primerjava vrednosti OTM med Kont+ in skupinami, ki so prejemale dodatek vitamina E (α , γ , $\alpha+\gamma$), je pokazala manjšo stopnjo poškodb DNA limfocitov pri vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek vitamina E. Repni moment po Olivu se sicer uporablja kot kompleksen parameter za ocenjevanje poškodb DNA in je izračunan kot razlika med srednjo vrednostjo deleža DNA v repu in v glavi, pomnožena z deležem DNA v repu kometa. Po mnenju Oliva in sod. (1992) naj bi bil boljši pokazatelj prisotnosti oksidativnega stresa kot delež DNA v repu oziroma v glavi kometa. V tem smislu se zdi zanimivo, da je delovanje γ -tokoferola prišlo do izraza le pri preprečevanju poškodb DNA limfocitov, saj se pri ostalih parametrih, ki smo jih uporabili za merjenje oksidacijskega stresa ni izkazal kot učinkovit. Razlog za ta pojav bi bilo mogoče pripisati večji retenciji γ -tokoferola v limfocitih. V študiji Jianga in Amesa (2003) so pri podganah ugotovili pomembno vlogo γ -tokoferola pri preprečevanju vnetja. Na mestu vnetja so izmerili manjšo koncentracijo eikozanoidov PGE₂ in LTB₄ v primerjavi s skupino, ki je prejela α -tokoferol, kar nakazuje na protivnetno vlogo γ -tokoferola. Zanimiv je tudi rezultat, ki kaže, da γ -tokoferol vpliva na maščobnokislinsko sestavo tkiv. V stegnu smo večje deleže dolgoveržnih maščobnih kislin zasledili v skupini, ki je prejela dodatek γ -tokoferola. Ker γ -tokoferol sicer ni imel vloge pri preprečevanju oksidacije maščob v organizmu, ne moremo trditi, da je to posledica zmanjšane oksidacije maščobnih kislin, kot sta to za α -tokoferol predlagala Surai in Sparks (2000).

Pri merjenju antioksidacijskega statusa v krvni plazmi s pomočjo metod ACL in FRAP in obsega lipidne oksidacije z merjenjem koncentracije MDA v krvni plazmi se γ -tokoferol ni izkazal kot učinkovit. Nasprotno je dodatek α -tokoferola v krmo uspel zmanjšati koncentracijo MDA v krvni plazmi in povečati njeno antioksidativno kapaciteto. Čeprav se FRAP metoda uporablja predvsem za merjenje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov, saj temelji na moči redukcije železa in Fe³⁺ v Fe²⁺ obliko, ta reakcija pa je po naravi hidrofилna (Yeum in sod., 2004), so bile vrednosti pri skupini, ki je prejela 67 mg/kg α -tokoferola, večje. Kar se tiče merjenja antioksidativne kapacitete v maščobi topnih antioksidantov (ACL), so do podobnih ugotovitev pri piščancih prišli Voljč in sod. (2011). Vrednosti FRAP in ACL se pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh oblik niso razlikovale od ostalih skupin, kar nakazuje na delno učinkovitost kombinacije α - in γ -tokoferola in najverjetneje odraža vsebnost α -tokoferola v krvni plazmi. Ta se je namreč povečevala z naraščanjem vsebnosti te oblike v krmi. Koncentracija MDA v plazmi je bila pri skupini $\alpha+\gamma$ primerljiva s koncentracijo, ki smo jo izmerili pri skupini α , v jetrih je bila učinkovitost celo večja, saj se je koncentracija MDA zmanjšala le v tej skupini. O interakciji delovanja med α - in γ -tokoferolom sta poročala že Bieri in Poukka Evarts (1974b), ki sta ugotovila, da je pojavnost nekroze jeter pri podganah, ki so prejemale kombinacijo teh dveh tokoferolov, manjša kot pri skupini, ki je prejela samo α -tokoferol. Tomasch in sod. (2001) so v študiji, v katero je bilo vključenih 28 moških prostovoljcev

sklepali na sinergistično delovanje med tema dvema oblikama vitamina E. Preučevali so antioksidativno delovanje α - in γ -tokoferola, pri čemer so ugotovili, da kljub večjemu razmerju med nenasičenimi in NMK v koruznem olju v primerjavi z mešanico olivnega in sončničnega olja (4,2 : 1,2), ni bilo razlik v antioksidativni kapaciteti plazme in LDL med preučevanima skupinama. Avtorji so tak učinek pripisali sinergističnemu delovanju α - in γ -tokoferola, saj je koruzno olje vsebovalo znatno večje količine γ -tokoferola.

Kot smo že omenili, se je koncentracija α -tokoferola v krvni plazmi, jetrih in mišicah povečevala sorazmerno s količino α -tokoferola v krmi. Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi raziskovalci, ki so ugotovili, da se z dodajanjem α -tokoferola v krmo povečuje njegova koncentracija tako v krvni plazmi (Voljč in sod., 2011), kot v prsni (Lanari in sod., 2004; Voljč in sod., 2011) in stegenski mišici (Lanari in sod., 2004) ter jetrih (Surai in Sparks, 2000; Villaverde in sod., 2010). Koncentracije α -tokoferola v vseh preiskovanih tkivih v naši raziskavi so bile veliko večje kot koncentracije γ -tokoferola, če primerjamo skupini α in γ , ki sta prejeli enaki količini obeh tokoferolov. Čeprav se vsi tokoferoli v črevesju absorbirajo v enaki meri, v jetrih prihaja do razlik med njimi pri vgrajevanju v VLDL. Pri tem namreč sodeluje α -TTP, ki omogoča prednostno vgrajevanje α -tokoferola, ostale oblike se presnovijo in izločijo s sečem in žolčem (Traber in Kayden, 1989). Behrens in Madère (1983) sta pri podganah preučevala odvisnost koncentracije α - in γ -tokoferola v krvni plazmi in jetrih od koncentracije, ki se nahaja v krmi in ugotovila, da se koncentracija γ -tokoferola v plazmi in jetrih poveča le v primeru, ko živali ne dobijo α -tokoferola s krmo. Preferenca α -TTP do α -tokoferola je tako velika, da so že zelo majhne zaužite količine dovolj, da se vgradi v VLDL in s tem prepreči nalaganje γ -tokoferola. V naši raziskavi smo tudi v skupini, ki je prejela le γ -tokoferol določili koncentracijo α -tokoferola, ta je bila sicer majhna, vendar v nasprotju s pričakovanjem, saj je bila krma, ki so jo piščanci prejeli sestavljena iz sestavin, ki vsebujejo zelo malo α -tokoferola. Poleg tega je bilo laneno olje, ki je sicer dober vir vitamina E, očiščeno v postopku deodorizacije. Wagner in sod. (2004) so v preglednem članku o učinkovitosti γ -tokoferola predlagali, da se zaradi delovanja mikroflore v prebavilih γ -tokoferol lahko pretvori v α -tokoferol. V študiji, ki sta jo objavila Clément in Bourre (1997), se je pri podganah sorazmerno s povečevanjem količine γ -tokoferola v obroku povečevala koncentracija α -tokoferola v krvnem serumu in tkivih.

Koncentracije vitamina E smo določili v več vrstah tkiv in sicer poleg krvne plazme in jeter ter prsne in stegenske mišice, ki smo jih že omenili, še v srčni mišici, trebušni maščobi in v možganih. Določevali smo vsebnosti α -, β -, γ - in δ - tokoferola, vendar so bile koncentracije β - in δ -tokoferola pod mero detekcije. Razlike v koncentracijah α - in γ -tokoferola so se v različnih tkivih zelo razlikovale. Če se osredotočimo na koncentracije α -tokoferola v skupini α in koncentracije γ -tokoferola v skupini γ , lahko posplošimo, da se največ α -tokoferola naloži v srčni mišici, sledijo jetra, stegenska

mišica, trebušna maščoba, krvna plazma, najmanjše koncentracije α -tokoferola smo izmerili v prsni mišici in možganih. Pri γ -tokoferolu so bile največje koncentracije izmerjene v trebušni maščobi, sledita stegenska in srčna mišica, nato jetra, krvna plazma in prsna mišica. Podobno kot pri α -tokoferolu, smo najmanj γ -tokoferola določili v možganih. Raziskav, v katerih bi pri piščancih določevali vsebnost oziroma koncentracije tako α - kot γ -tokoferola nismo zasledili, so pa Botsoglou in sod. (2003), Lanari in sod. (2004) in Eder in sod. (2005) določili večje koncentracije α -tokoferola v stegenski kot v prsni mišici. Podobno so večje koncentracije α - in γ -tokoferola v teh dveh mišicah izmerili Jensen in sod. (1997). V njihovi raziskavi je bila vsebnost maščobe v stegenski mišici štirikrat večja kot v prsni, večje vsebnosti tokoferolov v stegenski mišici so avtorji pojasnili kot posledico večjega deleža membranskega tkiva in večji presnovni aktivnosti v stegenski mišici. V več tkivih pri piščancih sta koncentracije α -tokoferola izmerila Surai in Sparks (2000). Največje koncentracije α -tokoferola sta določila v maščobnem tkivu, sledila so jetra, srce, trebušna slinavka in pljuča, med katerima ni bilo razlik, nekoliko manjše koncentracije sta izmerila v vranici, mišici, testisih, kjer so bile količine enake kot v ledvicah, najmanj α -tokoferola sta izmerila v možganih (tako v velikih kot v malih možganih). Clément in Bourre (1997) sta raziskovala, kako na vsebnost γ -tokoferola v različnih tkivih vpliva krmljenje različnih količin te oblike vitamina E. Podgane sta krmila s krmo, ki je vsebovala konstantno količino α -tokoferola (30 mg/kg) in različne količine γ -tokoferola (v razmerju 1, 2, 4 in 5 proti 1), poleg sta uporabila še skupino brez dodanih tokoferolov in skupini, ki sta prejemale le po 30 mg/kg α - oziroma γ -tokoferola. Koncentraciji obeh tokoferolov sta merila v krvnem serumu, jetrih, srcu, mišici, sprednjih možganih in endonevriju. Ugotovila sta, da se koncentracija obeh tokoferolov povečuje s količino dodanega γ -tokoferola. Pri večjem razmerju med γ - in α -tokoferolom je bila koncentracija obeh tokoferolov večja. Statistične primerjave koncentracij obeh tokoferolov v posameznih tkivih sicer nista opravila, v koncentraciji α -tokoferola si po vrsti sledijo srce, endonevrij, sprednji možgani, jetra, mišica in serum, v koncentraciji γ -tokoferola pa srce, endonevrij, jetra, mišica, sprednji možgani in serum.

5.2 VPLIV RAZLIČNIH VIROV MAŠČOBE TER α - IN γ -TOKOFEROLA PRI OKSIDACIJI MESA

S prehrano živali lahko močno vplivamo na sestavo mesa. Zaradi krmljenja krme z veliko vsebnostjo VNMK se poveča količina teh maščobnih kislin v tkivih. Tovrstne spremembe so sicer s strani zdravja potrošnikov zaželene, vendar zaradi večje dovzetnosti VNMK na oksidacijo (Grau in sod., 2001) prihaja do poslabšanja kakovosti takih izdelkov. Tekom povečanega obsega oksidacijskih procesov prihaja do tvorbe neprijetnega okusa in vonja, spremeni se tudi barva, kar vpliva na funkcionalno, senzorično in prehransko vrednost mesa in mesnih izdelkov (Gray in sod., 1996). Z dodajanjem antioksidantov v krmo, eden najbolj raziskanih je prav vitamin E, lahko

preprečimo oksidacijo takih izdelkov (Cortinas in sod., 2005), zaradi česar se podaljša obstojnost mesa (Ruiz in sod., 2001). Dodajanje vitamina E v krmo domačih živali je pomembno z več vidikov. Vitamin E izboljša proizvodne rezultate ter zdravstveno stanje živali. Izboljša se antioksidativni status in kvaliteta hrane živalskega izvora. Poveča se vsebnost vitamina E v živalskih produktih in s tem količina vitamina E v prehrani ljudi (Flachowsky in sod., 2002). Številne raziskave so z dodajanjem vitamina E v krmo živali potrdile izboljšanje produktivnosti živali (Guo in sod., 2001), boljšo oksidativno stabilnost mesa (Flachowsky in sod., 1997; Lauridsen in sod., 1997; Guo in sod., 2001; Cortinas in sod., 2004; Zhang in sod., 2009; Narciso-Gatyán in sod., 2010) ter povečano vsebnost vitamina E v živalskih tkivih (Flachowsky in sod., 1997; Lauridsen in sod., 1997; Guo in sod., 2001; Flachowsky in sod., 2002; Zhang in sod., 2009). α -Tokoferol se inkorporira v celične membrane, kjer prihaja do iniciacije lipidne oksidacije in tako deluje že na mestu samem, s čimer prepreči vzpostavitev verižne reakcije lipidne peroksidacije (Lauridsen in sod., 1997). Dodajanje α -tokoferola v krmo je v naši raziskavi zmanjšalo tvorbo MDA, vendar v vseh pogojih skladiščenja ne popolnoma, če koncentracije primerjamo s tistimi, ki smo jih izmerili pri skupini, ki je prejela palmino mast. Dodajanje γ -tokoferola v večini primerov ni bilo učinkovito, medtem ko je bil učinek kombinacije obeh tokoferolov v nekaterih primerih skladiščenja primerljiv s skupino α . Še posebej je učinek kombinacije obeh tokoferolov prišel do izraza v prsni mišici, kjer je bil primerljiv s skupino, ki je prejela 67 mg/kg α -tokoferola. V stegenski mišici je bila kombinacija učinkovita pri vzorcih, ki so bili shranjeni 4 mesece v zamrzovalniku. Cortinas in sod. (2005) so ugotovili, da se z naraščanjem vsebnosti α -tokoferola v krmi zmanjšuje obseg lipidne oksidacije tako v svežem mesu kot v mesu shranjenem v hladilniku. Podobno so pri shranjevanju prsne in stegenske mišice v hladilniku ugotovili Narciso-Gatyán in sod. (2010). Kar se tiče učinkovitosti γ -tokoferola so Jensen in sod. (1997) prišli do podobnih rezultatov kot so predstavljeni v naši raziskavi. γ -Tokoferol namreč ni bil učinkovit pri preprečevanju lipidne oksidacije, vzrok za to so pripisali slabši inkorporaciji γ -tokoferola v jetrih. V literaturi izsledkov o delovanju kombinacije α - in γ -tokoferola nismo zasledili, vendar lahko glede na predstavljene rezultate izpostavimo učinkovitost krmljenja kombinacije obeh tokoferolov. Učinkovitost krmljenja kombinacije obeh tokoferolov je bila primerljiva s krmljenjem večjih količin samo α -tokoferola, na podlagi česar lahko sklepamo o ugodnem delovanju kombinacije α - in γ -tokoferola pri zaviranju lipidne oksidacije v piščančjem mesu.

5.3 VPLIV KRMLJENJA RAZLIČNIH VIROV MAŠČOB TER α -, γ -TOKOFEROLA IN NJUNE KOMBINACIJE NA TRANSKRIPCIO GENOV

5.3.1 Vpliv krmljenja lanenega olja v primerjavi s palmino mastjo na izražanje genov

5.3.1.1 Vpliv VNMK na gene, ki sodelujejo pri presnovi maščob in holesterola

Maščobne kisline so najpogostejša oblika, v kateri je energija shranjena v organizmu in tudi oblika, v kateri se energija po telesu prenaša. Presnova maščob v jetrih je močno koordiniran proces, nanj vplivajo transkripcijski faktorji in jedrni receptorji. Pri pticah so jetra tudi glavno mesto, kjer prihaja do *de novo* lipogeneze, oziroma tvorbe maščobnih kislin iz drugih virov energije. Maščobne kisline vplivajo na regulacijo genov predvsem preko vpliva na štiri družine transkripcijskih faktorjev: PPAR, LXR, HNF4 α in SREBF (Nguyen in sod., 2008). Maščobne kisline naj bi vplivale tudi na regulacijo vnetnih procesov, Pal in sod. (2012) so na primer pred kratkim pokazali, da se maščobne kisline vežejo na protein fetuin-A, ki ga izločajo jetra, in na TLR4, s čimer so odkrili povezavo med maščobnimi kislinami in kroničnimi vnetnimi procesi, ki vplivajo na občutljivost organizma na inzulin. Vpliv maščob na razvoj vnetnih procesov so preučevali tudi Cani in sod. (2007, 2008). Osredotočili so se na vpliv zauživanja velikih količin maščob na pojavnost presnovnih motenj, ki vodijo v razvoj debelosti in sladkorne bolezni. Ugotovili so, da se zaradi zauživanja krme z veliko vsebnostjo maščobe (72 % energijske vrednosti obroka) v črevesju poveča delež mikrobiote, ki vsebuje LPS, kar vpliva na prepustnost črevesne stene in posledično na količino LPS v krvni plazmi. Pri teh živalih so ugotovili povečan obseg vnetja v maščobnem tkivu in začetek razvoja inzulinske rezistence v jetrih (Cani in sod., 2007). V naslednji raziskavi (Cani in sod., 2008) so študijo nadgradili in ugotovili, da so imele miši, sicer krmljene s krmo bogato z maščobami, vendar z dodatkom antibiotika, zmanjšan obseg metabolne endotoksemije in zmanjšano vsebnost LPS v črevesju. Pri teh miših so opazili zmanjšan obseg glukozne intolerance, manjši prirast, manjši razvoj maščobnega tkiva, manjši obseg vnetja in manjšo pojavnost oksidacijskega stresa. Spremembe v črevesni mikrobioti zaradi zauživanja krme z veliko vsebnostjo maščobe so namreč vplivale na vnetje v visceralnem maščobnem tkivu, na oksidacijski stres in infiltracijo makrofagov, o čemer pričajo večkratne korelacije med temi rezultati.

Raziskave kažejo tudi, da zaradi zauživanja NMK pride do vnetja v β celicah trebušne slinavke, kar pripomore k razvoju sladkorne bolezni, ki je pereč problem v razvitem svetu (Eguchi in sod., 2012). S tem ko NMK vplivajo na aktivacijo TLR, povzročijo aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki vpliva na transkripcijo različnih vnetnih citokinov npr. IL-6 in TNF- α . Zauživanje NMK torej vodi v razvoj vnetja v organizmu, kot posledico vnetja pa Siriwardhana in sod. (2013) v preglednem članku omenjajo zmanjšan obseg lipolize v organizmu. Kot možne ukrepe proti zmanjšanju vnetja in

posledično na lipolizo navajajo zauživanje n-3 VNMK, polifenolov, ENMK in konjugirane linolne kisline.

Na manjši obseg vnetja v maščobnem tkivu naj bi vplivala tudi aktivacija PPAR α v jetrih (Moller in Berger, 2003). Ta transkripcijski faktor uravnava delovanje encimov, ki so pomembni pri oksidaciji maščobnih kislin in vpliva na transkripcijo proteinov in encimov, ki so potrebni pri prenosu in katabolizmu maščobnih kislin (Pégorier in sod., 2004). Na transkripcijo PPAR α vpliva LPIN1 (Finck in sod., 2006). V naši raziskavi sta bila oba gena - *LPIN1* in *PPARA* v skupini, ki je prejela laneno olje, znižano izražena v primerjavo s skupino, ki je prejela palmino mast, kar nakazuje na manjše izgorevanje maščob v skupini Kont+. O povezavi med PPAR α in HNF4 α poročajo Marcil in sod. (2010). V študiji, kjer so preučevali vlogo transkripcijskega faktorja HNF4 α pri Caco-2 celicah, so namreč ugotovili vlogo HNF4 α pri presnovi maščob. Pri celicah, ki tega gena niso imele, je prišlo do sprememb v transkripciji genov za SREBF-2 in PPAR α ter LXR- α in - β , poleg tega so pri teh celicah opazili manjši celični transport maščob, ki se je pokazal v manjšem izločanju hilomikronov in njihovih apoB-48 enot. Tudi v naši raziskavi je zaradi spremembe v viru maščobe v obroku prišlo do razlik v izražanju tega gena, saj je bil *HNF4A* pri skupini Kont+ povišan izražen. Povečano izražanje *PPARA* vpliva tudi na transkripcijo *PDK4* (Sugden in sod., 2002). Ta protein ima pomembno vlogo pri presnovi glukoze, saj zavira delovanje piruvat dehidrogenaznega kompleksa, ki sodeluje pri vstopu piruvata v cikel citronske kisline (Jump in sod., 2005). Ker je bil tudi ta gen v Kont+ znižano izražen, lahko sklepamo, da je bila glukoza glavni vir energije pri piščancih, ki so zauživali laneno olje.

Lipogeneza je ena glavnih presnovnih poti v organizmu, pri kateri prihaja do sinteze maščobnih kislin iz drugih virov energije, najpogosteje iz ogljikovih hidratov. Proces uravnava tako prehranski kot tudi hormonski dejavniki. Povečana je v primeru, ko so obroki bogati z ogljikovimi hidrati, po drugi strani je pri obrokih, ki vsebujejo veliko maščobe ter v pogojih stradanja lipogeneza okrnjena. Poleg maščobnega tkiva so jetra glavno mesto, kjer prihaja do lipogeneze (Nguyen in sod., 2008). Yoon in sod. (2009) so v svoji raziskavi pokazali, da je SREBF-1c eden glavnih transkripcijskih faktorjev, ki vpliva na lipogenezo v jetrih. Na izražanje *SREBF1C* vpliva SIK1, saj se pri povišanem izražanju *SIK1* zmanjša transkripcija lipogenih genov (*FASN* in *ACACA*), medtem ko izbitje tega gena povzroči povišano transkripcijo omenjenih genov. V naši raziskavi je bil *SIK1* pri skupini Kont+ znižano izražen, kar pomeni, da je bil obseg lipogeneze v skupini, ki je prejela VNMK, večji. V stimulacijo lipogeneze v jetrih je v veliki meri vpleten tudi gen *MID1IP1*. V raziskavi Inoue-ja in sod. (2011) je povečano izražanje tega gena v podganjih jetrih povzročilo večjo *de novo* sintezo maščobnih kislin. Pri piščancih iz naše študije je bil ta gen povišan izražen v skupini Kont+. Pomembno vlogo pri presnovi maščob v jetrih, še posebej vpliv na sintezo maščob pripisujejo genu *CYP2C*. Pri sesalcih imajo geni iz skupine CYP2C pomembno vlogo pri detoksifikaciji

ksenobiotikov, hkrati sodelujejo pri presnovi drugih endogenih spojin, kot so steroidi in VNMK. Carré in sod. (2002) so pokazali, da do podobnega izražanja teh genov prihaja tudi pri piščancih. V njihovi študiji je pri vitki liniji piščancev, ki so imeli večji delež linolne kisline v plazmi, prišlo do znižanega izražanja *CYP2C*. Ta gen naj bi po njihovem mnenju vplival na znižano izražanje genov, ki so vpleteni v sintezo maščob. V naši raziskavi je bil gen, ki kodira *CYP2C45*, pri piščancih iz skupine Kont+ veliko višje izražen kot pri Kont-. Kontrolni skupini se sicer nista razlikovali v deležu linolne kisline v jetrih, je pa imela Kont- večji delež arahidonske kisline (C18:4n-6), katere prekursor je prav linolna kislina. Ker igra ta gen pomembno vlogo pri sintezi maščob v jetrih, lahko sklepamo, da je bila sinteza maščob pri skupini, ki je prejemale laneno olje, večja.

V skupini, ki je prejemale laneno olje, je bil znižano izražen gen *HMGCL*, ki kodira encim vpleten v nastanek ketonskih teles. Ker ketonska telesa nastajajo v pogojih, ko prihaja do povečanega izgorevanja maščob v organizmu, lahko le potrdimo dejstvo, da je v naši študiji zaradi zauživanja krme bogate z lanenim oljem prišlo do spremembe v presnovi maščob v smeri njihove sinteze. Vpliv lanenega olja na manjše izgorevanje maščob v naši raziskavi potrjuje tudi znižano izražen gen *PCK1* v skupini Kont+. Ta gen namreč kodira glukoneogeni encim fosfoenolpiruvat karboksikinazo, ki katalizira pretvorbo oksaloacetata v fosfoenolpiruvat (Beale in sod., 2007). O vplivu VNMK na izgorevanje maščob pričajo rezultati, o katerih poročajo avtorji drugih raziskav (Sampath in Ntambi, 2004; Lee in sod., 2008; Sun in sod., 2011). Večje zauživanje n-3 VNMK naj bi po njihovem mnenju vodilo v večje izgorevanje maščob v organizmu. V naši raziskavi do takih rezultatov nismo prišli, saj krmljenje n-3 VNMK piščancem ni vplivalo na transkripcijo tistih genov, na podlagi katerih bi lahko sklepali o večjem izgorevanju maščob. Glede na rezultate mikromrež lahko torej sklepamo, da se zaradi krmljenja velikih količin VNMK v obliki lanenega olja močno spremeni presnova maščob, večina genov, ki je bila med kontrolnima skupinama različno izražena, namreč nakazuje, da se je zaradi krmljenja VNMK povečala lipogeneza v jetrih, v smeri povečane *de novo* sinteze maščobnih kislin priča tudi različno izražanje genov, ki so vpleteni v regulacijo glukoneogeneze in sinteze ketonskih teles.

Razlike v izražanju genov, ki so povezani s presnovo maščob, smo opazili tudi pri genih, ki kodirajo hormone vpletene v presnovne poti, ki jih regulirajo ščitnični hormoni. Dva gena iz vrst deiodinaz sta bila različno izražena, in sicer je bil *DIO2* v skupini Kont+ povišano izražen, *DIO3* pa znižano. *DIO2* sodeluje pri aktivaciji tiroidnih hormonov, po drugi strani ima *DIO3* obratno funkcijo. Izražanje teh genov v naši raziskavi je v skladu z rezultati o katerih poročajo Ferrini in sod. (2010). V njihovi raziskavi so imeli piščanci, ki so prejemale laneno olje, večje koncentracije T3 hormona v primerjavi s tistimi, ki so prejemale obrok z dodatkom govejega loja. Večkrat

nenasičene maščobne kisline potemtakem presnovno maščob uravnavajo tudi preko delovanja na ščitnične hormone.

Aktivacija PPAR α ima poleg vpliva na presnovno maščob vlogo tudi pri presnovi holesterola, saj naj bi preko vpliva na znižano transkripcijo SREBF-2 ta gen vplival na manjšo sintezo holesterola (König in sod., 2007). Eikozapentaenojska kislina (C20:5n-3), n-3 VNMK, je v raziskavi, ki so jo izvedli Sugiyama in sod. (2008), pri miših vplivala na zmanjšanje koncentracije holesterola v krvni plazmi, poleg tega so pri teh živalih odkrili manjše količine proteina SREBF-2. Gen, ki kodira PPAR α , je bil v naši raziskavi znižano izražen v skupini, ki je prejela laneno olje, *SREBF2* pa povišano (P=0,07), kar potrjuje dejstvo, da je transkripcija teh dveh genov povezana, vendar ni v skladu z rezultati (Sugiyama in sod., 2008), ki nakazujejo k temu da n-3 VNMK vplivajo na manjšo sintezo holesterola. Tudi izražanje drugih genov, katerih produkti vplivajo na sintezo holesterola v jetrih, potrjujejo vpliv lanenega olja na povečano sintezo holesterola. Gena, ki sodelujeta pri biosintezi holesterola v jetrih - *FDFT1* in *HMGCR* sta bila v skupini Kont+ povišano izražena. Čeprav se je pokazal vpliv krmljenja n-3 VNMK na povečano transkripcijo genov, ki so vpleteni v sintezo holesterola, med kontrolnima skupinama nismo opazili razlik v koncentraciji plazemskega holesterola. Sklepamo lahko, da je bilo trajanje poskusa prekratko in se vpliv sinteze holesterola še ni odražal na koncentraciji holesterola ali pa je prišlo do sprememb v povratnem transportu holesterola ali izločanju holesterola s pomočjo žolča.

5.3.1.2 Vpliv različnih virov maščobe na izražanje genov povezanih z oksidacijskim stresom

Zauživanje krme bogate z VNMK povečuje verjetnost, da v organizmu pride do oksidacijskega stresa (Lauridsen in sod., 1999). Že fenotipski rezultati, ki smo jih predstavili v raziskavi, nazorno prikazujejo, da se zaradi zauživanja lanenega olja v primerjavi s palmino mastjo poveča oksidacija maščobnih kislin v organizmu. Koncentracije MDA so bile večje v skupini, ki je prejela laneno olje. Tudi rezultati analize mikromrež kažejo na to, da ima krmljenje maščobnih kislin z več nenasičenimi vezmi vpliv na oksidacijski stres v organizmu. Krmljenje lanenega olja je povzročilo povišano izražanje genov *PIK3R1* in *NFE2L2*. PIK3R sodeluje pri uravnavanju delovanja NFE2L2 (Kim in sod., 2010), ta je glavni transkripcijski faktor, ki vpliva na transkripcijo genov, katerih produkti so vpleteni v detoksifikacijo in eliminacijo reaktivnih kisikovih spojin (Li in sod., 2007). Njegov dimerizacijski faktor je ATF4. Gen, ki kodira ATF4, je bil prav tako povišano izražen v Kont+. NFE2L2 inducira transkripcijo *OSGIN1*, gena, na čigar povišano izražanje je v raziskavi Li in sod. (2007) vplivala izpostavljenost oksidirane oblike 1-palmitoil-2-arahidonoil-sn-glicero-3-fosforilholina. Ta se nahaja v spremenjenih LDL na mestih, kjer prihaja do aterosklerotičnih lezij in na drugih mestih kroničnih vnetnih bolezni. Oksidirani

fosfolipidi so v njihovi študiji povečali izražanje *Osgin1* preko delovanja NFE2L2, kar nakazuje k temu, da oksidacijski stres vpliva na izražanje tega gena. Po mnenju avtorjev naj bi bil OSGIN1 vpleten tudi v mehanizme pri drugih patoloških stanjih, pri katerih igra oksidacijski stres pomembno vlogo. Vpliv krmljenja VNMK potrjuje tudi znižano izražen gen za protein COQ10b. To je protein, ki veže CoQ in je pomemben za pravilno delovanje elektronske prenašalne verige, saj je odgovoren za prenos CoQ v mitohondrijskih membranah pri evkariontskih celicah (Barros in sod., 2005; Cui in Kawamukai, 2009). Gen, ki kodira ta protein je bil v Kont+ trikrat nižje izražen kot v Kont-.

Marcil in sod. (2010) so ugotovili, da ima pomembno vlogo pri oksidacijskem stresu tudi HNF4 α , transkripcijski faktor, ki smo ga omenili že zaradi vloge, ki jo ima v presnovi maščob. V njihovi raziskavi je izbitje tega gena pri Caco-2 celicah povzročilo povečanje oksidacijskega stresa, kar se je pokazalo v večjih koncentracijah MDA in konjugiranih dienov, poleg tega tudi v zmanjšanem nastajanju antioksidativnih encimov (katalaza, glutation peroksidaza in hem oksigenaza-1). Hkrati je bila pri celicah, ki niso imele gena za kodiranje tega transkripcijskega faktorja znižano izražanje proteina NFE2L2. V naši raziskavi je bilo izražanje tega gena pri skupini Kont+ 3,1 krat višje kot pri Kont-, kar potrjuje vlogo HNF4 α pri oksidacijskem stresu. Na podlagi povišano izraženih genov *HNF4A* in *NFE2L2* v Kont+ lahko torej sklepamo o večji produkciji proteinov, ki vplivajo na obrambo proti oksidacijskemu stresu.

Oksidacijski stres je bil v naši raziskavi posledica zauživanja n-3 VNMK, pri analizi jetrnega transkriptoma smo opazili razlike v izražanju genov, ki vplivajo na uravnavanje oksidacijskega stresa. V skupini, ki je prejela laneno olje, so bili povišano izraženi geni, katerih produkti vplivajo na eliminacijo reaktivnih kisikovih spojin. O večjem obsegu oksidacijskega stresa pri piščancih, ki so prejeli laneno olje pričajo tudi ostale analize, s pomočjo katerih smo merili raven oksidacije (koncentracija MDA), analiza transkriptoma torej potrjuje rezultate metabolomskih analiz.

5.3.2 Vpliv izomer vitamina E na izražanje genov

5.3.2.1 Vpliv vitamina E na izražanje genov povezanih s presnovo maščob in holesterola

Vitamin E lahko vpliva na transkripcijo genov, ki so vpleteni v presnovo maščob, vendar so rezultati raziskav, ki so preučevale vpliv vitamina E v tej smeri, različni. Tako na primer Eder in Kirchgessner (1998) pri podganah nista ugotovila zaviralnega učinka vitamina E na izražanje genov, ki kodirajo lipogene encime, v nasprotju Li in sod. (2009) poročajo o vplivu vitamina E na izražanje genov vpletenih v presnovo maščob pri Beijing-you piščancih. Prav tako pri piščancih so Xiao in sod. (2011) ugotovili vpliv

vitamina E na izražanje genov povezanih s presnovo maščob. Raziskav, ki bi preučevale vpliv vitamina E na presnovo holesterola prav tako ni veliko. Rota in sod. (2004) v eni izmed njih poročajo o nižjem izražanju *7-DHCR*, ki katalizira enega izmed zadnjih korakov v sintezi holesterola, zaradi vpliva vitamina E v podganjih testisih. V večji meri o učinku vitamina E na znižano izražanje holesterolnih genov poročajo raziskovalci, ki so tak vpliv preučevali na celičnih kulturah. Valastyan in sod. (2008) so pri celicah HepG2 C3A ugotovili zaviralen učinek vitamina E na sintezo holesterola, prav tako Landrier in sod. (2010), ki so delovanje vitamina E preučevali na Caco-2 celicah. V njihovi študiji je do znižanega izražanja genov vpletenih v sintezo holesterola prišlo tako zaradi učinka α - kot tudi γ -tokoferola.

V naši raziskavi se je vpliv na izražanje genov, vpletenih v sintezo holesterola, pokazal predvsem pri skupini, ki je prejela α -tokoferol. Veliko genov, ki regulirajo sintezo holesterola, je bilo pri tej skupini v primerjavi s kontrolno skupino (Kont+) znižano izraženih. To so *SQLE*, *FDFT1*, *DHCR7*, *NSHDL*, *FDPS*, *HMGCR*, *ID11*, *LSS*. V študiji Valastyana in sod. (2008) prav tako poročajo o znižanem izražanju teh genov pod vplivom vitamina E v HepG2 C3A celicah. V raziskavi so avtorji ugotovili tudi povezavo s *SREBF-2*, saj imajo ti geni skupno vezavno mesto za ta transkripcijski faktor. O vlogi *SREBF-2* pri sintezi holesterola poročajo tudi König in sod. (2007). Na znižano izražanje tega gena je vplivalo povišano izražanje *PPARA*, posledično se je izražanje genov, ki so vpleteni v sintezo holesterola, zmanjšalo. V naši raziskavi je bil gen za *PPAR α* povišano izražen v vseh treh skupinah, ki so dobivale dodatek tokoferolov, znižano izražen gen *SREBF2* smo opazili le pri skupini α . Dodatek α -tokoferola je vplival tudi na znižano izražanje *SCP2*, gena ki je prav tako povezan s presnovo holesterola. Ta gen je bil pri skupini α 1,9-krat nižje izražen kot v Kont+. Atshaves in sod. (2009) so ugotovili njegov zaviralen učinek na proteine, ki sodelujejo pri prenašanju in sintezi holesterola, in na tiste, ki sodelujejo pri oksidaciji in prenašanju žolčnih kislin. Tudi *SIK1* deluje zaviralno na transkripcijo genov, ki so povezani s sintezo holesterola (Okamoto in sod., 2004). Ta gen je bil pri vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek tokoferolov, povišano izražen. Poleg funkcije pri presnovi holesterola ima *SIK1* vlogo tudi pri presnovi glukoze in maščob. V študiji, kjer so preučevali vpliv tega gena (Koo in sod., 2005), so namreč ugotovili, da zaradi sprememb v njegovem izražanju prihaja do sprememb v izražanju glukoneogenih genov. Prav tako se je pokazal njegov učinek na gene, povezane s sintezo maščob, saj je *SIK1* vplival na izražanje genov *FASN* in *ACACA*. Razlike med skupinama Kont+ in α smo opazili tudi v izražanju gena *ANGPTL3*, njegov produkt je protein, ki inhibira delovanje lipoprotein lipaze in s tem zavira sprostitvev holesterola iz LDL (Li, 2006). Ta gen je bil pri skupini α 2,6-krat nižje izražen.

Glede na podatke, ki smo jih pridobili s tehnologijo mikromrež, smo sklepali, da bi se lahko nižja raven izražanja genov za biosintezo holesterola pri skupini α odražala v nižji

koncentraciji plazemskega holesterola, vendar je analiza fenotipskih podatkov pokazala, da je koncentracija holesterola v skupini α celo večja kot pri Kont+. Ker je bil *CETP* v skupini α nižje izražen kot v Kont+, lahko povečane koncentracije holesterola v plazmi pripišemo manjšemu povratnemu toku holesterola. Ta protein naj bi namreč imel vlogo pri povratnem transportu holesterola, to je pot pri kateri se holesterol iz tkiv prenaša do jeter in potem naprej do žolča, s katerim se izloči. Pri tem se holesterol najprej veže na HDL in se prenese do jeter, nekaj se ga s pomočjo delovanja *CETP* prenese tudi na LDL in VLDL (Barter in sod., 2003). Možen vzrok za večje koncentracije holesterola bi lahko bila tudi povečana reciklaža holesterola v jetrih. Kot povzeto v preglednem članku Izzat in sod. (2000), se kar 95 % v črevesje izločenih žolčnih kislin v jetrih reciklira. S tem se količina holesterola, ki je potreben za *de novo* sintezo žolčnih kislin, zmanjša, saj se lahko uporabi reciklirani holesterol. Bhat in sod. (2003) so dosegli zmanjšanje plazemskega holesterola s tem ko so zmanjšali reciklažo holesterola. S prekinitvijo reabsorpcije žolčnih kislin se poveča katabolizem holesterola, posledično se koncentracija plazemskega holesterola zmanjša. V naši raziskavi so bili rezultati nasprotni. Pri skupini α je bila koncentracija plazemskega holesterola večja, s tem da je bila izraženost genov, ki sodelujejo pri sintezi holesterola, nižja. Sklepamo lahko, da je do povečanja koncentracije holesterola prišlo tudi zaradi povečanja reabsorpcije žolčnih kislin, bogatih s holesterolom, iz črevesja.

Glede na različno izražanje genov, ki urejajo delovanje ščitničnih hormonov in genov, ki sodelujejo pri presnovi holesterola, lahko sklepamo tudi na neposredno povezavo med tema dvema presnovnima potema. Že Shin in Osborne (2003) sta ugotovila, da tiroidni hormoni vplivajo na presnovo holesterola preko *SREBF-2*. Podoben trend v izražanju teh genov smo opazili tudi v naši raziskavi. Dodatek tokoferolov je namreč vplival na izražanje *DIO2* in *DIO3*, ki uravnavata pretvorbo med neaktivno in aktivno obliko ščitničnih hormonov. *DIO2* je hormon iz skupine deiodinaz, zaradi njegovega delovanja se tiroksin, ki je neaktivna oblika ščitničnih hormonov, pretvori v aktivno obliko T3 oz. trijodtironin. *DIO3* pripisujemo obratno delovanje, saj inaktivira T4 in hkrati zmanjšuje aktivnost T3 (Köhrle, 1999). Izražanje *DIO2* je bilo v vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek vitamina E nižje kot v Kont+, hkrati je bilo izražanje *DIO3* v teh treh skupinah višje, na podlagi česar lahko sklepamo o manjši sintezi holesterola pri skupinah, ki so prejemale dodatek tokoferolov.

Ščitnični hormoni sodelujejo tudi pri presnovi maščob, Park in sod. (1995) so na primer ugotovili, da je izražanje gena, ki kodira *CPT1 α* , povečano v hipertiroidnem stanju. Ta encim je sicer odgovoren za transport maščobnih kislin preko mitohondrijske membrane, kar omogoča njihovo oksidacijo in s tem rabo maščobnih kislin kot vira energije. Gen za ta encim je bil pri skupinah γ in $\alpha+\gamma$ v primerjavi s Kont+ povišano izražen, kar kaže na večji transport maščobnih kislin v mitohondrije in s tem na njihovo večjo oksidacijo. V teh dveh skupinah smo opazili tudi razlike v izražanju deiodinaz,

DIO2 je bil znižano izražen v primerjavi s Kont+, *DIO3* pa povišano. Na podlagi rezultatov analize mikromrež lahko torej tudi v naši raziskavi sklepamo na povezavo med delovanjem ščitničnih hormonov in *CPT1 α* .

Pomembno vlogo pri presnovi maščob so Zhang in sod. (2004) pripisali tudi *PPARGC-1 α* , saj naj bi stimuliral izražanje *CPT1A* in *PDK4*. V njihovi študiji se je zaradi delovanja *PPARGC-1 α* povečala oksidacija maščobnih kislin in nastajanje *CPT1 α* in *PDK4* v mitohondrijih. V naši raziskavi je bil *PPARGC1A* v skupinah γ in $\alpha+\gamma$ povišano izražen, kar potrjuje vpliv obeh tokoferolov na večje izgorevanje maščob. Yoon in sod. (2001) so ugotovili, da *PPARGC-1 α* vpliva tudi na izražanje *PPARA*, Lin in sod. (2003) pa poročajo, da vpliva na povečano nastajanje glukoze v jetrih. Povečano izražanje genov *ADIPOQ* in *SIRT1* prav tako potrjuje, da vitamin E vpliva na presnovo maščob in glukoze. *ADIPOQ* namreč stimulira izražanje *SIRT1*, kar vodi v aktivacijo *PPARGC-1 α* (Iwabu in sod., 2010). *SIRT1* je bil v primerjavi s Kont+ povišano izražen v skupini α , medtem ko je bilo izražanje *ADIPOQ* višje v vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek tokoferolov. Liu in sod. (2012) so pri miših, ki so imele izbit gen za *ADIPOQ* ugotovili, da je veliko število genov, ki so vpleteni sintezo encimov, vpletenih v presnovo glukoze in maščob, znižano izraženih. Tako so bili znižano izraženi geni, ki kodirajo encime vpletene v uravnavanje glikolize, cikla trikarboksilnih kislin in sinteze holesterola. Znižano izražen je bil pri teh miših gen, ki kodira *PPAR α* , kar predstavlja razlog za znižano izražanje lipogenih genov. Prav tako je bil znižano izražen *HNF4A*, kar potrjuje vpletenost *ADIPOQ* v presnovo maščob v jetrih.

Družina transkripcijskih koaktivatorjev *PPARGC1* presnovo maščob povezuje tudi z vnetnimi procesi ter vpliva na izražanje antioksidativnih encimov, saj povečuje obseg celičnega dihanja v mitohondrijih (Lin in sod., 2005). Pri izražanju genov, ki so vpleteni v oksidacijo maščob, je pomemben tudi gen, ki kodira *PDK4*. Ta ima pglavlitno vlogo pri presnovi ogljikovih hidratov. Zaradi delovanja tega encima se spremeni presnova v smeri rabe maščobnih kislin kot vira energije. *PDK4* namreč vpliva na reverzibilno fosforilacijo piruvat dehidrogenaznega kompleksa, ga inaktivira in s tem povzroči povečano oksidacijo maščobnih kislin in varčevanje z glukozo. Razpoložljivi piruvat se posledično s pomočjo glukoneogeneze pretvori v glukozo. Izražanje tega gena je bilo povišano v vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek vitamina E. Delovanje *PDK4* je povezano tudi z delovanjem *PPAR α* (Dey in Swaminathan, 2010). Ta transkripcijski faktor poleg drugih funkcij povečuje izražanje genov ki so vpleteni v oksidacijo maščobnih kislin v mitohondrijih in povečuje izražanje genov, ki sodelujejo pri oksidaciji piruvata (Song in sod., 2010).

V smeri večje rabe maščobnih kislin kot vira energije v vseh treh skupinah z dodanim vitaminom E kaže tudi povišano izražanje *HMGCL*. Ta gen kodira ketogeni encim 3-hidroksimetil-3-metilglutaril-CoA-liazo, zaradi česar se poveča nastajanje ketonskih

teles. V raziskavi, ki so jo objavili Désert in sod. (2008) je bilo izražanje tega gena močno povečano pri piščancih, ki 16 ur niso zaužili krme. V naši raziskavi smo ugotovili tudi velike razlike v izražanju gena, ki kodira protein GALE. V skupinah α in $\alpha+\gamma$ je bila razlika signifikantna, pri skupini γ je bila signifikanca nekoliko manjša ($P=0,09$). Ta encim igra poglavitno vlogo v presnovi galaktoze, saj pretvarja galaktozo v glukozo-1-fosfat v Leloirjevem ciklu. Encim katalizira tudi izomerizacijo UDP-N-acetilgalaktozamina in UDP-N-acetilglukoze ter ima potemtakem vlogo pri sintezi prekursorjev glikoproteinov in glikolipidov (Thoden in sod., 2001).

Na podlagi analize mikromrež lahko sklepamo, da dodajanje α - in γ -tokoferola ter njune kombinacije v krmo, ki je bila obogatena z n-3 VNMK, spremeni presnovo maščob in holesterola v jetrih piščancev. Vpliv na presnovo holesterola se je pokazal predvsem pri skupini, ki je prejela 67 mg/kg α -tokoferola, medtem ko vpliv pri skupinah, ki sta prejela γ -tokoferol in kombinacijo obeh izomerov vitamina E ni bil tako izrazit. Pri skupini α smo na podlagi znižanih izraženih genov, ki so vpleteni v biosintezo holesterola, sklepali na manjšo koncentracijo holesterola v krvni plazmi, vendar so fenotipske analize pokazale, da temu ni tako. Koncentracija holesterola pri tej skupini je bila celo nekoliko večja. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da je do znižanja izražanja teh genov prišlo ravno zaradi večje koncentracije holesterola v krvni plazmi, zaradi česar *de novo* sinteza holesterola v jetrih ni bila potrebna. Pri presnovi maščob smo glede na razlike v izražanju genov, ki so vpleteni v oksidacijo maščob, sklepali na vpliv obeh tokoferolov in njune kombinacije v smeri večje rabe maščob kot vira energije.

5.3.2.2 Vpliv vitamina E na izražanje genov, ki so povezani z oksidacijskim stresom

Dodatka 67 mg/kg α -tokoferola in polovičnih količin α - in γ -tokoferola sta bila učinkovita pri zmanjšanju koncentracije MDA v plazmi in jetrih. Različno izraženi geni, povezani z regulacijo oksidacijskega stresa pri skupinah, ki so prejemale dodatek vitamina E v primerjavi s Kont+, potrjujejo vpletenost vitamina E v pogojih oksidacijskega stresa. Najprej omenimo *COQ10B*. Pri vseh treh skupinah, ki so prejemale vitamin E, je bilo izražanje tega gena povišano. *COQ10B* kodira protein, ki je pomemben pri delovanju elektronske prenašalne verige, saj sodeluje pri prenašanju CoQ iz enega mesta na drugo v membranah mitohondrijev (Cui in Kawamukai, 2008).

Kot že omenjeno pri razpravi, ki zadeva vpliv krmljenja različnih virov maščobe na gene, ki so povezani z regulacijo oksidacijskega stresa, je *HNF4A* vpleten v obrambo pred reaktivnimi kisikovimi spojinami in vpliva na izražanje *NFE2L2* (Marcil in sod., 2010). Dodatek vitamina E je v naši raziskavi vplival na znižano izražanje *HNF4A*, vpliv se je pokazal pri vseh treh skupinah. Delovanje vitamina E pri izražanju *NFE2L2* je bilo značilno le pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov, izražanje

tega gena je bilo v tej skupini v primerjavi s Kont+ znižano. V tej skupini je bilo znižano tudi izražanje gena *PIK3R1*. Ta gen je bil znižano izražen tudi pri piščancih iz skupine γ . Protein, ki ga ta gen kodira, je pomemben pri prenosu NFE2L2 na antioksidativni odzivni element (Marcil in sod., 2010). V skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov, je bil znižano izražen tudi *ATF4*, ki inducira izražanje *HMOX1* in je vpleten v obrambo pred oksidacijskim stresom (Alam in sod., 1999, He in sod., 2001), na podlagi česar lahko sklepamo, da oksidacijski stres v tej skupini ni bil tako izrazit. *HMOX1* je bil prav tako v tej skupini nižje izražen, povišano izražen je bil v tej skupini gen, ki kodira *GSTO1*. Isti gen je bil v skupini α znižano izražen. Enak vpliv α -tokoferola smo ugotovili pri genih, ki kodirata *GSTA3* in *GSTM2*. Vsi trije geni so iz skupine, ki kodirajo sintezo glutation S-transferaz. Delovanje *GSTO1* naj bi se odražalo pri redukciji dehidroaskorbata (Whitbread in sod., 2005), *GSTA* delujejo kot glutation peroksidaze (Board, 1998), *GSTM* sodelujejo pri detoksifikaciji elektrofilnih substanc (Vorachek in sod., 1991).

Oksidacijski stres vpliva tudi na izražanje MAPK fosfataz, imenovanih tudi *DUSP*, te spadajo v družino proteinov, ki katalizirajo inaktivacijo MAPK in s tem sodelujejo pri koordinaciji celičnih procesov, kot sta proliferacija in apoptoza (Theodosiou in Ashworth, 2002). Oksidacija zavira delovanje teh fosfataz, saj so tarča reaktivnih kisikovih spojin. Gen, ki kodira *DUSP16* (tudi *MPK7*), je bil povišano izražen v vseh treh skupinah, ki so prejemale dodatek vitamina E. Kießling in sod. (2010) poročajo, da je zaradi delovanja reaktivnih kisikovih spojin prišlo do inhibicije *MPK7* in posledično do pojava vnetnih procesov in apoptoze. Inhibicija *MPK* je namreč povzročila defosforilacijo *JNK*, zaradi česar je prišlo do večjega izražanja pro-apoptotičnega proteina *BIM*. Podobno so pokazali tudi Kamata in sod. (2005). V njihovem delu je zaradi delovanja *TNF α* prišlo do produkcije reaktivnih kisikovih spojin, kar je povzročilo povečano aktivnost *JNK*, posledično do sproščanja citokroma c in sprostitev kaspaze c, kar je na koncu privedlo do nekrotične celične smrti.

Na podlagi znižano izraženih genov, ki so vpleteni v eliminacijo reaktivnih kisikovih spojin, lahko tudi s pomočjo rezultatov mikromrež sklepamo na manjšo prisotnost oksidacijskega stresa pri piščancih, ki so prejeli dodatek vitamina E v krmo. Zanimivo je, da je bilo največji vpliv opaziti pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov. Fenotipski rezultati sicer kažejo, da je bil oksidacijski stres v najmanjši meri prisoten v skupini, ki je prejela 67 mg/kg α -tokoferola, vendar je bilo mogoče pri nekaterih parametrih podoben vpliv zaslediti tudi pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov. S povezavo rezultatov transkriptomskih in metabolomskih analiz lahko sklepamo, da je z dodajanjem zadostnih količin α -tokoferola in kombinacije α - in γ -tokoferola v krmo piščancev, ki je sicer podvržena lipidni oksidaciji, v veliki meri možno preprečiti poškodbe, ki so posledica delovanja prostih radikalov.

5.3.2.3 Vpliv izomer vitamina E na izražanje genov, ki so povezani z vnetnimi in imunskimi procesi

O vlogi α -tokoferola pri regulaciji imunskih in vnetnih procesov pri piščancih poročajo Xiao in sod. (2011). Znižano izražanje *IL6* v vranici pri piščancih, ki so prejeli naravni vir α -tokoferola, so ugotovili Kaiser in sod. (2012) in s tem sklepali na manjši vnetni odziv pri teh živalih. V naši raziskavi se je vpliv vitamina E na izražanje genov, ki so vpleteni v tovrstne procese pokazal predvsem pri skupini, ki je prejela γ -tokoferol, v manjši meri tudi pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov.

Vlogo α -tokoferola pri preprečevanju celične smrti so ugotovili Gonzáles in sod. (2007), ki so preučevali delovanje te izomere vitamina E v kulturi človeških hepatocitov izpostavljenih D-galaktozaminu. V njihovi raziskavi je preko vpliva α -tokoferola na PPAR α prišlo do manjše aktivnosti NF- κ B in NOS-2. Na izražanje NF- κ B, ki je glavni regulator v pogojih stresa, sicer vpliva veliko različnih dejavnikov, od LPS, TNF- α in ostalih citokinov, vse do zunanjih stresnih dejavnikov. Je glavni negativni regulator programirane celične smrti, predvsem pri odzivu na TNF α in njemu podobne citokine (Karin in Lin, 2002). Wu in sod. (2009) so na primer v svoji raziskavi pokazali, da daljša izpostavljenost pogojem oksidativnega stresa vpliva na celično signaliziranje vpleteno v aktivacijo NF- κ B. V naši raziskavi je bil pri skupinah γ in α + γ višje kot v pozitivni kontrolni skupini izražen gen *NFKBIA*, ki je znan kot inhibitor delovanja NF- κ B.

Med skupinama Kont+ in γ je bilo različno izraženih kar nekaj genov iz vrst IRF. Ti proteini uravnavajo transkripcijo interferonov. IRF-1 in IRF-2 sta znana transkripcijska faktorja vpletena v regulacijo interferonov, s tem da IRF-1 deluje kot transkripcijski aktivator, IRF-2 pa zmanjšuje delovanje IRF-1 (Harada in sod., 1994; Tanaka in sod., 1993). *IRF1* je bil pri skupini γ nižje izražen kot v kontrolni skupini, izražanje *IRF2* je bilo v skupinah γ in α + γ povišano. Gen *IRF4* je bil v skupini γ 1,3-krat nižje izražen. Negishi in sod. (2005) poročajo o vlogi IRF-4 pri negativni povratni regulaciji TLR signaliziranja. Tudi *IRF8* je bil v obeh skupinah, ki sta prejeli γ -tokoferol, znižano izražen, čeprav je bila statistična značilnost pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov, nekoliko manjša. Ta protein je sicer dobro izražen v imunskem sistemu, nanj vpliva IFN- γ , pomemben je predvsem njegov vpliv na delovanje makrofagov (Kuwata in sod., 2002). Tudi *IRF10* igra vlogo pri uravnavanju imunskega sistema, saj uravnava izražanje nekaterih genov, ki so tarče IFN- γ (Nehyba in sod., 2002). Ta gen je bil pri skupinah γ in α + γ 1,2-krat nižje izražen kot v Kont+. Dodatek samo α -tokoferola ni vplival na izražanje nobenega izmed zgoraj naštetih genov.

Na vlogo γ -tokoferola pri uravnavanju imunskih procesov kaže slabša izraženost *LY96* v skupini γ . *LY96* kodira protein MD-2, poznan tudi pod angleškim imenom lymphocyte

antigen 96, ki se veže na lipopolisharide in s tem vpliva na aktivacijo receptorja TLR4 (Shimazu in sod., 1999). Tudi *TLR2-2* je bil znižano izražen v skupinah γ in $\alpha+\gamma$, v teh skupinah je bilo znižano tudi izražanje *RSFR*, gena, ki kodira nastanek baktericidne levkocitne ribonukleaze A-2 (Nitto in sod., 2006).

Tudi razlike v izražanju genov, ki kodirata *FST* in *INHBA* nakazujejo vlogo vitamina E pri regulaciji vnetnih procesov. Stimulacijo *INHBA* povzročijo vnetni citokini, medtem ko *FST* inhibira delovanje aktivina A (Jones in sod., 2004; de Kretser in sod., 2012). V naši raziskavi je na povišano izražanje *FST* vplival dodatek γ -tokoferola in kombinacije obeh tokoferolov, medtem ko je bila statistična značilnost pri skupini α nekoliko slabša ($P=0,06$). V skladu z boljšim izražanjem *FST* je bil *INHBA* v skupinah γ in $\alpha+\gamma$ znižano izražen. Pomembno vlogo pri aktivaciji T-celic ima *ICER*, ki je bil v vseh treh skupinah v primerjavi s pozitivno kontrolo povišano izražen. V študiji Bodorja in sod. (2001) je pri transgenskih timocitih, pri katerih je bilo povečano izražanje proteina *ICER*, prišlo do zmanjšanja koncentracije IL-2 in INF- γ , hkrati pri teh celicah ni prišlo do izražanja genov, ki kodirajo makrofagne vnetne proteine α in β (*MIP-1 α* in *MIP-1 β*).

Na podlagi analize transkriptoma lahko povzamemo, da na izražanje genov, ki so vpleteni v regulacijo imunskega sistema vpliva predvsem dodatek γ -tokoferola, saj je do razlik pri izražanju tovrstnih genov prišlo predvsem pri skupini γ , v manjši meri tudi v skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov. Dodatek samo α -tokoferola skoraj ni vplival na izražanje genov, ki sodelujejo pri regulaciji imunskega sistema. V tej smeri se zdi zanimivo tudi opažanje, ki smo ga zasledili pri ocenjevanju poškodb DNA limfocitov. Učinkovitost delovanja γ -tokoferola se je pri fenotipskih analizah pokazala samo pri tej metodi. Učinka γ -tokoferola pri ostalih analizah, s pomočjo katerih smo ocenjevali vpliv različnih oblik vitamina E na preprečevanje oksidacijskega stresa pri piščancih, nismo ugotovili. Na podlagi analiz transkriptoma v kombinaciji z rezultati kometnega testa lahko sklepamo, da se delovanje γ -tokoferola kaže predvsem pri imunskem sistemu, vendar bi za točnejše zaključke potrebovali dodatne analize, s katerimi bi dokazali, da γ -tokoferol v pogojih oksidacijskega stresa sodeluje pri eliminaciji reaktivnih dušikovih spojin, v nasprotju z α -tokoferolom, ki je učinkovit pri preprečevanju poškodb zaradi delovanja kisikovih radikalov.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Krmljenje lanenega olja, ki je bogato z n-3 VNMK je povečalo oksidacijski stres v organizmu in lipidno oksidacijo v piščančjem mesu.
- Dodatek 67 mg RRR- α -tokoferola (100 IU vitamina E) na kg krme je zmanjšal poškodbe DNA limfocitov, povečal antioksidacijski status krvne plazme in zmanjšal lipidno oksidacijo v krvni plazmi. Poleg tega je krmljenje α -tokoferola povečalo oksidacijsko stabilnost piščančjega mesa. Njegov vpliv lahko pripišemo veliki retenciji α -tokoferola v organizmu, ki se je razlikovala v posameznih tkivih. Največ α -tokoferola je vsebovala srčna mišica, najmanj možgani.
- Dodatek 67 mg RRR- γ -tokoferola na kg krme je zmanjšal poškodbe DNA limfocitov, vendar ni imel vpliva na antioksidacijski status krvne plazme in na obseg lipidne oksidacije v organizmu. Prav tako ni vplival na povečano stabilnost piščančjega mesa. Retencija γ -tokoferola v organizmu je bila veliko manjša kot retencija α -tokoferola in se je razlikovala v posameznih tkivih. Največ γ -tokoferola se je naložilo v trebušni maščobi, najmanj v možganih.
- Dodatek kombinacije polovičnih količin obeh tokoferolov je zmanjšal poškodbe DNA limfocitov, nekoliko povečal antioksidacijski status v krvni plazmi in zmanjšal lipidno oksidacijo v organizmu. Pri preprečevanju oksidacije maščob v piščančjem mesu kombinacija ni bila tako učinkovita kot 67 mg/kg RRR- α -tokoferola.
- Pri preučevanju vpliva krmljenja lanenega olja na jetrni transkriptom smo ugotovili vpliv na gene, ki so vpleteni v presnovo maščob in holesterola. Na podlagi razlik v izražanju genov smo ugotovili, da je pri piščancih, ki so prejeli laneno olje, prišlo do manjšega izgorevanja maščob in večjega obsega lipogeneze, sinteza holesterola je bila glede na rezultate mikromrež pri piščancih, ki so zauživali laneno olje, večja. Različno izraženi geni, ki so povezani z regulacijo oksidacijskega stresa, potrjujejo fenotipske rezultate o vplivu krmljenja VNMK na povečanje oksidacijskega stresa v organizmu.
- Vpliv vitamina E na transkriptom se je pokazal pri genih, ki so vpleteni v presnovo maščob in holesterola. Pri vseh treh skupinah, ki so prejemale vitamin E, rezultati mikromrež nakazujejo na povečano izgorevanje maščob. Pri presnovi holesterola je bil vpliv najbolj očiten pri skupini, ki je prejela 67 mg/kg α -tokoferola. Pri tej skupini so bili geni, ki so vpleteni v biosintezo holesterola znižano izraženi. Vpliv na gene, ki so povezani z imunskimi in vnetnimi procesi, je bil opazen predvsem pri

skupini, ki je prejela γ -tokoferol, v nekoliko manjši meri tudi pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov. Na podlagi znižano izraženih genov, ki so vpleteni v eliminacijo reaktivnih kisikovih spojin, lahko tudi s pomočjo rezultatov mikromrež sklepamo na manjšo prisotnost oksidacijskega stresa pri piščancih, ki so prejeli dodatek vitamina E v krmo. Zanimivo je, da je bilo največji vpliv opaziti pri skupini, ki je prejela kombinacijo obeh tokoferolov.

- Na podlagi rezultatov raziskave smo prepričani o učinkovitosti α -tokoferola pri zmanjševanju oksidacijskega stresa *in vivo* in povečanju lipidne stabilnosti piščančjega mesa. V tem smislu je bila učinkovita tudi kombinacija obeh tokoferolov. Ker se je vpliv γ -tokoferola pokazal pri procesih, ki jih v raziskavi nismo natančneje raziskali, s tem mislimo na vlogo pri imunskih in vnetnih procesih, bi bile smiselne raziskave, ki bi natančneje raziskale tudi to področje. S tem bi pri piščancih dobili zaokrožen pogled na delovanje obeh oblik tokoferolov. Poleg tega se je v raziskavi pokazalo zanimivo odkritje, ki zadeva ugodno delovanje kombinacije polovičnih količin obeh tokoferolov. Tudi v tej smeri bi bile za natančnejšo interpretacijo potrebne dodatne raziskave, na podlagi katerih bi lahko z gotovostjo trdili, da je delovanje α - in γ -tokoferola sinergistično.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Pravilna prehrana domačih živali je potrebna za zagotavljanje pokritja njihovih potreb in je pomemben dejavnik pri preprečevanju razvoja različnih bolezni. Pravilna prehrana živali je pomembna tudi z vidika zagotavljanja kakovostne hrane za potrošnika, saj je meso vir kakovostnih beljakovin, vitaminov in mineralnih snovi, ki jih s hrano rastlinskega izvora težje zagotovimo. Podobno velja za druge živalske produkte. S strani potrošnika so problematične živalske maščobe, ki pogosto vsebujejo velik delež nasičenih maščobnih kislin (NMK) in holesterola, ki so v primeru, da jih zaužijemo v prevelikih količinah lahko povod za razvoj različnih bolezni. Ker lahko na maščobnokislinsko sestavo mesa in živalskih proizvodov vplivamo predvsem s pravilno prehrano, se v zadnjem času na tržišču pojavlja vse več primerov tako imenovane funkcionalne hrane. Dober primer take prakse je z n-3 večkrat nenasičenimi kislinami (VNMK) obogateno meso, teh maščobnih kislin namreč v prehrani sodobnega človeka primanjkuje. Ker je tovrstno meso bolj dovzetno za poškodbe, ki so posledica delovanja prostih radikalov, je bolj pokvarljivo, spremeni se njegov videz, okus in tekstura. Zaradi večjega zauživanja teh maščobnih kislin tudi v samem organizmu prihaja do oksidativnih sprememb, ki lahko vodijo v razvoj različnih bolezni. Zato je v prehrani živali, ki zauživajo povečane količine VNMK, potrebno zagotoviti zadostne količine antioksidantov, ki preprečujejo oksidativne spremembe tako v organizmu kot tudi v mesu in živalskih proizvodih.

Ker je vitamin E eden najbolj učinkovitih antioksidantov, ki preprečujejo oksidativne spremembe v maščobnem okolju, smo se odločili za raziskavo, v kateri smo preučevali vpliv α - in γ -tokoferola na preprečevanje lipidne oksidacije *in vivo* in v mesu. Delovanje α -tokoferola je na tem področju sicer dobro raziskano in večkrat potrjeno, v nasprotju se o delovanju γ -tokoferola ne ve prav veliko. V okviru raziskave smo se odločili preučiti tudi vpliv teh dveh tokoferolov na transkripcijo genov, ki pri piščancih prav tako ni podrobneje raziskan.

Izvedli smo prehranski poskus, v katerega smo vključili 46 en dan starih piščancev ROSS 308 in jih 30 dni krmili s posebej za poskus pripravljeno krmo. Razdelili smo jih v pet skupin. Za kontrolo smo uporabili dve skupini, katerih krma se je razlikovala v viru maščobe. Negativna kontrola (Kont-, N=10) je prejemale 5 % palmine masti, ki vsebuje predvsem NMK in zato ni dovzetna na oksidativne spremembe, pozitivna kontrola (Kont+, N=10) je prejemale isto količino lanenega olja, ki je dober vir n-3 večkrat nenasičenih α -linolenske kisline. V poskus smo vključili tri skupine, ki so prav tako prejemale 5 % lanenega olja, vendar so imele dodane večje količine vitamina E. Skupina α (N=10) je imela krmi dodanih 67 mg/kg RRR- α -tokoferola, skupina γ (N=8)

isto količino RRR- γ -tokoferola, skupina $\alpha+\gamma$ (N=8) je imela dodani polovični količini obeh tokoferolov. Kontrolni skupini sta prejeli le količino, ki po priporočilih zadostuje za pokritje osnovnih potreb pri piščancih pitancih, to je 10 mg/kg α -tokoferil acetata. Tekom poskusa smo spremljali prirast in zauživanje krme, po končanem poskusu pa živali žrtvovali in odvzeli vzorce krvi in tkiv za analize. Iz krvi smo izolirali limfocite in z analizo kometnega testa določili stopnjo poškodb DNA. V krvni plazmi smo analizirali koncentracije malondialdehida (MDA), koncentraciji α - in γ - tokoferola, trigliceridov in holesterola ter na dva načina izmerili antioksidativno kapaciteto (ACL in FRAP). Malondialdehid smo določili tudi v vzorcih jeter. V različnih vzorcih tkiv (jetra, srce, prsna in stegenska mišica, abdominalna maščoba, možgani) smo določili koncentraciji obeh tokoferolov. V vzorcih jeter, prsne in stegenske mišice smo analizirali maščobnokislinsko sestavo. Vzorce obeh mišic smo shranjevali pri različnih pogojih (sveži, 6 dni pri 4 °C, ter 2 in 4 mesece pri -20 °C) in v njih določili koncentracijo MDA. Pri žrtvovanju smo posebej odvzeli vzorce jeter, iz katerih smo izolirali RNA in s pomočjo analize mikromrež določili razlike v izražanju genov. Izbrane gene smo potrdili še z RT-qPCR.

Pri ovrednotenju rezultatov smo ugotovili, da krmljenje lanenega olja poveča oksidacijski stres tako v organizmu kot v mesu živali, o čemer smo sklepali iz povečanih koncentracij MDA v krvni plazmi, jetrih in mesu. Na antioksidativno kapaciteto krmljenje lanenega olja ni vplivalo, prav tako ne na poškodbe DNA limfocitov. Velike so bile razlike v maščobnokislinski sestavi obeh mišic in jeter, saj je bil delež VNMK pri Kont+ veliko večji, v skladu s tem je bil delež NMK manjši. Pri analizi jetrnega transkriptoma smo ugotovili, da ima krmljenje lanenega olja v primerjavi s palmino mastjo vpliv predvsem na gene, ki so vpleteni v presnovo maščob in holesterola in na gene povezane z oksidacijskim stresom. Z upoštevanjem delovanja genov, ki so bili različno izraženi, smo ugotovili, da je v naši raziskavi zaradi krmljenja lanenega olja prišlo do manjšega izgorevanja maščob, povečanega obsega lipogeneze in povečane sinteze holesterola.

Pri preučevanju vpliva vitamina E na preprečevanje oksidacijskega stresa v organizmu smo ugotovili, da je učinkovit predvsem α -tokoferol. Pri skupini α smo opazili zmanjšane koncentracije MDA tako v krvni plazmi kot tudi v mesu shranjenem na različne načine. Antioksidativna kapaciteta krvne plazme je bila pri skupini α največja. Pri skupini $\alpha+\gamma$ so bili rezultati, ki zadevajo oksidacijski stres nekoliko slabši, je pa bil vpliv na zmanjšanje MDA v jetrih največji pri tej skupini. γ -Tokoferol se pri preprečevanju oksidacijskega stresa v organizmu ni izkazal kot učinkovit. Rezultati so bili v večini primerov primerljivi s Kont+. Njegova slabša učinkovitost je najverjetneje posledica slabše inkorporacije te oblike v jetrih, saj so bile koncentracije γ -tokoferola v krvni plazmi in drugih analiziranih tkivih v primerjavi z α -tokoferolom veliko manjše. Vpliv γ -tokoferola smo zasledili le pri zmanjšanju poškodb DNA limfocitov, pri čemer

sta bili obe obliki tokoferola in njuna kombinacija enako učinkoviti. Zanimiv je tudi rezultat, ki zadeva maščobnokislinsko sestavo, v stegnih je bil delež dolgoverižnih VNMK največji ravno v skupini, ki je prejela γ -tokoferol.

Pri vplivu vitamina E na transkriptom smo ugotovili, da se pri krmljenju obeh tokoferolov in njune kombinacije spremeni transkripcija genov, ki so povezani s presnovo maščob. V vseh treh skupinah smo glede na razlike v izražanju genov v primerjavi s Kont+ sklepali na večje izgorevanje maščob v jetrih. Pri skupini α je bil najbolj opazen vpliv na znižano izražanje genov, ki so vpleteni v biosintezo holesterola, čeprav fenotipski rezultati koncentracije holesterola v krvni plazmi tega opažanja niso potrdili. Pri vseh treh skupinah se je pokazal vpliv na izražanje genov, ki so vpleteni v regulacijo oksidacijskega stresa, pri skupini γ dodatno na gene, ki so povezani imunostjo in regulacijo vnetnih procesov.

Rezultati raziskave potrjujejo hipotezo, da se zaradi krmljenja lanenega olja poveča oksidacijski stres v organizmu, ki ga lahko učinkovito preprečimo z dodajanjem zadostnih količin α -tokoferola v krmo. Pri nekaterih parametrih je učinkovita tudi polovična kombinacija obeh oblik. γ -Tokoferolu glede na rezultate raziskave antioksidativne vloge predvsem zaradi manjše retencije v organizmu ne moremo pripisati, so pa zanimivi rezultati, ki kažejo na njegovo vlogo pri imunskih in vnetnih procesih.

7.2 SUMMARY

Proper nutrition of farm animals is necessary to cover the animal's needs and is an important factor in preventing the development of various diseases. It is also important in terms of providing quality food to the consumer, as meat is a source of high quality proteins, vitamins and minerals. These are hardly provided by a sole vegetarian diet. The same is true for other animal products. On the other side, the meat and animal products often contain high proportions of saturated fat and cholesterol, which in the case that they are consumed in excess, may give rise to the development of various diseases. Since the fatty acid composition of meat and animal products is influenced mainly by a proper diet, the market offers more and more products of so-called functional foods. A good example of this practice is the n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) enriched meat. The nutrition of a modern man is often deficient of these fatty acids. However, such meat is more susceptible to damage caused by the action of free radicals, which can modify its appearance, taste and texture. The increased intake of these fatty acids also leads to oxidative modifications in the organism, which may give rise to the development of various diseases. Therefore, the sufficient amounts of antioxidants are needed in such diets to prevent oxidative changes.

Since vitamin E is one of the most effective antioxidants which prevent oxidative changes in fatty environment, we decided to investigate the effect of α - and γ -tocopherol in the prevention of lipid oxidation *in vivo* and in meat. The role of α -tocopherol in this area has been well investigated, in contrast to γ -tocopherol which hasn't been well explored. The impact of these two tocopherols on the transcription of genes was also evaluated. The role of vitamin E in this matter has namely been in chickens poorly studied.

For these purposes we carried out a 30 day nutritional trial, which included 46 one-day old chickens ROSS 308. The animals were divided into five groups. For control, we used two groups which feed differed in the source of fat. The negative control (Kont-, N=10) received 5 % of palm fat. It contains mainly saturated fatty acids and is therefore not susceptible to oxidative changes. The positive control (Kont +, N=10) received the same quantity of linseed oil, which is a good source of the n-3 polyunsaturated α -linolenic acid. The experiment also included three groups, which were treated with 5 % of linseed oil, but had a higher amount of added vitamin E. Group α (N=10) received 67 mg/kg of RRR- α -tocopherol, group γ (N=8) the same amount of RRR- γ -tocopherol and α + γ (N=8) half amounts of the two forms. The control groups received only the amount of vitamin E that is recommended to cover basic needs in chickens, that is 10 mg/kg of α -tocopheryl acetate. During the experiment we monitored weight gain and feed intake, at the end of the experiment the animals were sacrificed and samples of blood and tissues were collected for analysis. Lymphocytes were isolated from blood, and using

the comet assay the degree of DNA damage was determined. Blood plasma was analysed for the concentration of malondialdehyde (MDA), the concentration of α - and γ -tocopherol, triglycerides and cholesterol. Antioxidant capacity was measured in two different manners (antioxidant capacity of lipid soluble compounds - ACL and ferric reducing antioxidant power - FRAP). Malondialdehyde was determined also in liver samples. The concentration of tocopherols was determined in various tissue samples (liver, heart, breast and thigh muscle, abdominal fat, brain). The samples of liver, breast and thigh muscles were analysed for the fatty acid composition. The samples of both muscles were stored under different conditions (fresh, 6 days at 4°C, and 2 and 4 months at -20 °C), and the concentration of MDA in these samples was determined. At sacrifice we also collected samples of liver from which RNA was isolated and through the microarray analysis the differences in gene expression were determined. The selected differentially expressed genes were confirmed by the RT-qPCR.

The evaluation of the results showed that feeding linseed oil increased the oxidative stress in chicken organism and in meat. This conclusion was made due to the increased plasma and liver MDA and MDA concentration in meat of the group Kont+ relative to the Kont-. Feeding linseed oil had no effect on the antioxidant capacity and on lymphocyte DNA damage. There were significant differences found in the fatty acid composition of both muscles and liver, as the proportion of PUFA in Kont+ was much higher. In line with this, the proportion of saturated fatty acids was lower. In the liver transcriptome analysis, we found that feeding linseed oil in relation to palm fat mainly affected genes involved in lipid and cholesterol metabolism and also influenced the genes associated with oxidative stress. By following the functioning of the genes which were differently expressed, we found that feeding linseed oil reduced mitochondrial fat oxidation, increased the degree of lipogenesis and increased the synthesis of cholesterol.

Examining the effect of vitamin E in the prevention of oxidative stress in the organism, we discovered that α -tocopherol is the most effective form of vitamin E in this manner. In the case of group α , we observed reduced plasma MDA levels and reduced MDA levels in meat stored at various conditions. Antioxidant capacity of blood plasma was the largest in group α . The combination of both tocopherols was not as effective as α -tocopherol alone, although the reduced liver MDA concentrations indicated its efficiency. γ -Tocopherol showed no effect in the prevention of oxidative stress in the organism. The results were comparable with those of the group Kont+. Its poor efficiency is most likely due to its poor incorporation in the liver, since its concentration was in comparison to α -tocopherol much lower. The impact of γ -tocopherol was observed only in the reduction of the lymphocyte DNA damage. Both tocopherols, either alone or in combination showed the same results. Interesting are the results concerning the fatty acid composition, since the proportion of long-chain PUFA in the thigh muscle were the highest in group that received γ -tocopherol.

The microarray analysis results revealed that feeding both tocopherols and their combination modified the transcription of genes that are involved in lipid metabolism. Considering differences in the transcription of genes in all three groups that were given tocopherols relative to the Kont+, we concluded that vitamin E stimulates mitochondrial oxidation of lipids. α -Tocopherol also influenced the genes involved in cholesterol biosynthesis, indicating lower cholesterol synthesis in group receiving α -tocopherol. However, plasma cholesterol concentrations did not confirm these findings. The influence on the transcription of genes involved in the regulation of oxidative stress was found in all three groups supplemented with tocopherols. In group γ , the influence on genes related to immune and inflammatory processes was also found.

The results of the experiment are in accordance with the hypothesis stating that feeding linseed oil increases the susceptibility to oxidative stress, which can be prevented by the addition of α -tocopherol to the chicken diet. For certain parameters, the half combination of α - and γ -tocopherol was also sufficient. γ -Tocopherol alone showed no effect in the prevention of oxidative stress, which is most likely attributed to its poor retention in the organism. However, interesting are the results indicating its role in immune and inflammatory processes.

8 VIRI

- Abidi S. L., Mounts T. L. 1997. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 782: 25–32
- Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A. M. K., Cook J. L. 1999. Nrf2, a cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 26071–26078
- An B. K., Banno C., Xia Z. S. Tanaka K., Ohtani S. 1997. Effects of dietary fat sources on lipid metabolism in growing chicks (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116: 119–125
- Atshaves B. P., McIntosh A. L., Martin G. G., Landrock D., Payne H. R., Bhuvanendran S., Landrock K. K., Lyuksyutova O. I., Johnson J. D., Macfarlane R. D., Kier A. B., Schroeder F. 2009. Overexpression of sterol carrier protein-2 differentially alters hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed mice. *Journal of Lipid Research*, 50: 1429–1447
- Azzi A., Gysin R., Kempna P., Muntenau A., Negis Y., Villacorta L., Visarius T., Zingg J.-M. 2004. Vitamin E mediates signaling and regulation of gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031: 86–95
- Barella L., Muller P. Y., Schlachter M., Hunziker W., Stocklin E., Spitzer V., Meier N., De Pascual-Teresa S., Minihane A. M., Rimbach G. 2004. Identification of hepatic molecular mechanisms of action of alpha-tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, 1689: 66–74
- Barros M. H., Johnson A., Gin P., Marbois B. N., Clarke C. F., Tzagoloff A. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 42627–42635
- Barter P. J., Brewer Jr. H. B., Chapman M. J., Hennekens C. H., Rader D. J., Tall A. R. 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23: 160–167
- Beale E. G., Harvey B. J., Forest C. 2007. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 48: 89–95
- Behrens W. A., Madère R. 1983. Interrelationship and competition of α - and γ -tocopherol at the level of intestinal absorption, plasma transport and uptake. *Nutrition Research*, 3: 891–897

- Benzie I. F. F., Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of »Antioxidant power«: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76
- Bhat B. G., Rapp S. R., Beaudry J. A., Napawan N., Butteiger D. N., Hall K. A., Null C. L., Luo Y., Keller B. T. 2003. Inhibition of ileal bile acid transport and reduced atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by SC-435. *Journal of Lipid Research*, 44: 1614–1621
- Bieri J. G., Poukka Evarts R. 1974a. Vitamin E activity of γ -tocopherol in the rat, chick and hamster. *The Journal of Nutrition*, 104: 850–857
- Bieri J. G., Poukka Evarts R. 1974b. Gamma tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27: 980–986
- Blackstock W. P., Weir M. P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, 17: 121–127
- Board P. G. 1998. Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4. *Biochemical Journal*, 330: 827-831
- Bodor J., Feigenbaum L., Bodorova J., Bare C., Reitz Jr. M. S., Gress R. E. 2001. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *Journal of Leukocyte Biology*, 69: 1053–1059
- Botsoglou N. A., Grigoropoulou S. H., Botsoglou E., Govaris A., Papageorgiou G. 2003. The effect of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65: 1193–1200
- Botsoglou E., Govaris A., Christaki E., Botsoglou N. 2010. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 121: 17–22
- Bottje W., Enkvetchakul B., Moore R., McNew R. 1995. Effect of α -tocopherol on antioxidants, lipid peroxidation, and the incidence of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers. *Poultry Science*, 74: 1356–1369
- Bramley P. M., Elmadfa I., Kafatos F. J., Kelly F. J., Manios Y., Roxborough H. E., Schuch W., Sheehy P. J. A., Wagner K.-H. 2000. Review-Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 913–938
- Brody T. 1998. *Nutritional Biochemistry*. 2nd edition. San Diego, Academic Press: 1006 str.

- Brown L., van der Ouderaa F. 2007. Nutritional genomics: food industry applications from farm to fork. *British Journal of Nutrition*, 97: 1027–1035
- Campbell S. E., Stone W. L., Lee S., Whaley S., Yang H., Qui M., Goforth P., Sherman D., McHaffie D., Krishnan K. 2006. Comparative effects of RRR- α - and RRR- γ -tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *BioMedCentral Cancer*, 6: 13–27
- Cani P. D., Amar J., Iglesias M. A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D., Neyrinck A. M., Fava F., Tuohy K. M., Chabo C., Waget A., Delmée E., Cousin B., Sulpice T., Chamontin B., Ferrières J., Tanti J.-F., Gibson G. R., Casteilla L., Delzenne N. M., Alessi M. C., Burcelin R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56: 1761–1772
- Cani P. D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A. M., Delzenne N. M., Burcelin R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57: 1470–1481
- Carré W., Bourneuf E., Douaire M., Diot M. 2002. Differential expression and genetic variation of hepatic messenger RNAs from genetically lean and fat chickens. *Gene*, 299: 235–243
- Cassar-Malek I., Picard B., Bernard C., Hockuette J.-F. 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48: 701–710
- Chance B., Gao G. 1994. In vivo detection of radicals in biological reactions. *Environmental Health Perspectives*, 12: 29–32
- Chen K., Suh J., Carr A. C., Morrow J. D., Zeind J., Frei B. 2000 Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279: 1406–1412
- Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. V: Oxygen radicals in biological systems - *Methods in Enzymology*. Packer L. (ed.). San Diego, USA, Academic Press: 314–318
- Chojkier M., Houglum K., Lee K. S., Buck M. 1998. Long- and short-termed- α -tocopherol supplementation inhibits liver collagen a1(I) gene expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 275: 1480–1485
- Christen S., Woodal A. A., Shigenaga M. K., Southwell-Keely P. T., Duncan M. W., Ames B. N. 1997. γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: physiological implications. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*, 94: 3217–3222

- Clément M., Bourre J.-M. 1997. Graded dietary levels of RRR- γ -tocopherol induce a marked increase in the concentrations of α - and γ -tocopherol in nervous tissues, heart, liver and muscle of vitamin-E-deficient rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1334: 173–181
- Cooney R. V., Harwood P. J., Franke A. A., Narala K., Sundström A.-K., Berggren P.-O., Morgan L. J. 1995. Products of γ -tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F9) cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 259–269
- Cortinas L., Barroeta A. C., Galobart J., Jensen S. K. 2004. Distribution of α -tocopherol stereoisomers in liver and thigh of chickens. *British Journal of Nutrition*, 92: 295–301
- Cortinas L., Barroeta A. C., Villaverde C., Galobart J., Guardiola F., Baucells M. D. 2005. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Science*, 84: 48–55
- Cui T.-Z., Kawamukai M. 2009. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS Journal*, 276: 748–759
- De Pascale M. K., Bassi A. M., Patrone V., Villacorta L., Azzi A., Zingg J.-M. 2006. Increased expression of transglutaminase-1 and PPAR γ after vitamin E treatment in human keratinocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 447: 97–106
- Désert C., Duclos M. J., Blavy P., Lecerf F., Moreews F., Klopp C., Aubry M., Herault F., Le Roy P., Berri C., Douaire M., Diot C., Lagarrigue S. 2008. Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics*, 9: 611–629
- Devaraj S., Leonard S., Traber M. G., Jialal I. 2008. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 44: 1203–1208
- Dey A., Swaminathan, K. 2010. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Science*, 87: 197–214
- Drevon C. 1991. Absorption, transport and metabolism of Vitamin E. *Free Radical Research*, 14, 4: 229–246
- Duplus E., Glorian M., Forest C. 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 30749–30752

- Duthie S. J., Pirie L., Jenkinson A. McE., Narayanan S. 2002. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*, 17, 3: 211–214
- Eder K., Kirchgessner M. 1998. The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids*, 33: 277–283
- Eder K., Grünthal G., Kluge H., Hirche F., Spilke J., Brandsch C. 2005. Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen-stored meat of broiler chickens fed diets differing in type of fat and vitamin E concentrations. *British Journal of Nutrition*, 93: 633–643
- Eguchi K., Manabe I., Oishi-Tanaka Y., Ohsugi M., Kono N., Ogata F., Yagi N., Ohto U., Kimoto M., Miyake K., Tobe K., Arai H., Kadowaki T., Nagai R. 2012. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metabolism*, 15: 518–533
- Eitenmiller R., Lee J. 2004. *Vitamin E - Food chemistry, composition and analysis*. New York, Marcel Dekker: 505 str.
- Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872–879
- Ferrini G., Manzanilla E. G., Menoyo D., Esteve-Garcia E., Baucells M. D., Barroeta A. C. 2010. Effects of dietary n-3 fatty acids in fat metabolism and thyroid hormone levels when compared to dietary saturated fatty acids in chickens. *Livestock Science*, 131: 287–291
- Finck B. N., Gropler M. C., Chen Z., Leone T. C., Croce M. A., Harris T. E., Lawrence Jr. J. C., Kelly D. P., 2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metabolism*, 4: 199–210
- Fischer A., Pallauf J., Gohil K., Weber S. U., Packer L., Rimbach G. 2001. Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285: 470–475
- Flachowsky G., Schöne F., Schaarmann G., Lübbe F., Böhme H. 1997. Influence of oilseeds in combination with vitamin E supplementation in the diet on backfat quality of pigs. *Animal Feed Science and Tehnology*, 64: 91–100
- Flachowsky G., Engelman D., Sünder A., Halle I., Sallmann H. P. 2002. Eggs and poultry meat as tocopherol sources in dependence on tocopherol supplementation of poultry diets. *Food Research International*, 35: 239–243
- Frank J., de Pascual Teresa S., Rimbach G. 2006. Nutrigenomics – new frontiers in antioxidant research. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 3: 1–12

- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj 16. Posvetovanje o prehrani domačih živali »Zdravčevi-Erjavčevi« dnevi, Radenci, 8. - 9. november 2007. Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota: 27–40
- Frankič T., Salobir J., Rezar V. 2008. The effect of vitamin E supplementation on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 141: 274–286
- Fukunaga K., Takama K., Suzuki T. 1995. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*, 230: 20–23
- Galli F., Azzi A. 2010. Present trends in vitamin E research. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 33–42
- Ghormade V., Khare A., Baghel R. P. S. 2011. Nutrigenomics and its applications in animal science. *Veterinary Research Forum*, 2: 147–155
- Gobert M., Gruffat D., Habeanu M., Parafita E., Bauchart D., Durand D. 2010. Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science*, 85: 676–683
- González R., Collado J. A., Nell S., Briceño J., Tamayo M. J., Fraga E., Bernardos A., López-Cillero P., Pascussi J. M., Rufián S., Vilarem M. J., De la Mata M., Brigelius-Flohe R., Maurel P., Muntané J. 2007. Cytoprotective properties of α -tocopherol are related to gene regulation in cultured D-galactosamine-treated human hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 1439–1452
- Grau A., Guardiola F., Grimpa S., Barroeta A. C., Codony R. 2001. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Science*, 80: 1630–1642
- Gray J. I., Goma E. A., Buckley D. J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43: 111–123
- Gropper S. S., Smith J. L., Groff J. L. 2009. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5th edition. Belmont, Australia, Wadsworth/Cengage learning: 600 str.
- Guo Y., Tang Q., Yuan J., Jiang Z. 2001. Effects of supplementation with vitamin E on the performance and the tissue peroxidation of broiler chicks and the stability of thigh meat against oxidative deterioration. *Animal Feed Science and Technology*, 89: 165–173
- Gysin R., Azzi A., Visarius T. 2002. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *The FASEB Journal*, 16: 1952–1954

- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. New York, Oxford University Press: 936 str.
- Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1147–1150
- He C. H., Gong P., Hu B., Stewart D., Choi M. E., Choi A. M. K., Alam J. 2001. Identification of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 20858–20865
- Harada H., Takahashi E.-I., Itoh S., Harada K., Hori T.-A., Taniguchi T. 1994. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: Implications for a gene network in the interferon system. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 2: 1500–1509
- Huang H.-Y., Alberg A. J., Norkus E. P., Hoffman S. C. Comstock G. W., Helzlsouer K. J. 2003. Prospective study of antioxidant micronutrients in the blood and the risk of developing prostate cancer. *American Journal of Epidemiology*, 157: 335–344
- Inoue J., Yamasaki K., Ikeuchi E., Satoh S., Fujuwara Y., Nishimaki-Mogami T., Shimizu M., Sato R. 2011. Identification of MIG12 as a mediator for stimulation of lipogenesis by LXR activation. *Molecular Endocrinology*, 25: 995-1005
- Iwabu M., Yamauchi T., Okada-Iwabu M., Sato K., Nakagawa T., Funata M., Yamaguchi M., Namiki S., Nakayama R., Tabata M., Ogata H., Kubota N., Takamoto I., Hayashi Y.K., Yamauchi N., Waki H., Fukayama M., Nishino I., Tokuyama K., Ueki K., Oike Y., Ishii S., Hirose K., Shimizu T., Touhara K., Kadowaki T. 2010. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464: 1313–1319
- Izzat N. N., Deshazer M. E., Loose-Mitchell D. S. 2000. New molecular targets for cholesterol-lowering therapy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293: 315–320
- Jensen C., Engberg R., Jakobsen K., Skibsted L. H., Bertelsen G. 1997. Influence of the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. *Meat Science*, 47: 211–222
- Jiang Q., Elson-Schwab I., Courtemanche C., Ames B. N. 2000. γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 97: 11494–11499
- Jiang Q., Christen S., Shigenaga M.-K., Ames B. N. 2001. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 714–722

- Jiang Q., Ames B. N. 2003. γ -Tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *The FASEB Journal*, 17: 816–822
- Jones K. L., de Kretser D. M., Patella S., Phillips, D. J. 2004. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 225: 119–125
- Ju J., Picinich S. C., Yang Z., Zhao Y., Suh N., Kong A.-N., Yang C. S. 2010. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*, 31: 533–542
- Jump D. B., Botolin D., Wang Y., Xu J., Christian B., Demeure O. 2005. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *The Journal of Nutrition*, 135: 2503–2506
- Kaiser M. G., Block S. S., Ciraci C., Fang W., Sifri M., Lamont S. J. 2012. Effects of dietary vitamin E type and level on lipopolysaccharide-induced cytokine mRNA expression in broiler chicks. *Poultry Science*, 91: 1893–1898
- Kamata H., Honda S., Maeda S., Chang L., Hirata H., Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, 120: 649–661
- Kaput J., Ordovas J. M., Ferguson L., van Ommen B., Rodriguez R. L., Allen L., Ames B. N., Dawson K., German B., Krauss R., Malyj W., Archer M. C., Barnes S., Bartholomew A., Birk R., van Bladeren P., Bradford K. J., Brown K. H., Caetano R., Castle D., Chadwick R., Clarke S., Clément K., Cooney C. A., Corella D., da Cruz I. B. M., Daniel H., Duster T., Ebberson S. O., Elliot R., Fairweather-Tait S., Felton J., Fenech M., Finley J. W., Fogg-Johnson N., Gill-Garrison R., Gibney M. J., Gillies P. J., Gustaffson J.-A., Hartman J. L., He L., Hwang J.-K., Jais J.-P., Jang Y., Joost H., Junien C., Kanter M., Kibbe W. A., Koletzko B., Korf B. R., Kornman K., Krempin D. W., Langin D., Lauren D. R., Lee J. H., Leveille G. A., Lin S. J., Mathers J., Mayne M., McNabb W., Milner J. A., Morgan P., Muller M., Nikolsky Y., van der Ouderaa F., Park T., Pense N., Perez-Jimenez F., Poutanen K., Roberts M., Saris W. H. M., Schuster G., Shelling A. N., Simopoulos A. P., Southon S., Tai E. S., Towne B., Trayhum P., Uauy R., Visek W. J., Warden C., Weiss R., Wiencke J., Winkler J., Wolff G. L., Zhao-Wilson X., Zucker J.-D. 2005. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *British Journal of Nutrition*, 94: 623–632
- Karin M., Lin. A. 2002. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3: 221–227

- Kasimanickam R. K., Kasimanickam V. R. 2011. Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPAR γ and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology*, 76: 482–491
- Kim J. W., Lim S. C., Lee M. Y., Lee J. W., Oh W. K., Kim S. K., Kang K W. 2010. Inhibition of neointimal formation by trans-resveratrol: Role of phosphatidyl inositol 3-kinase-dependent Nrf2 activation in heme oxygenase-1 induction. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 1497–1505
- Kieβling M. K., Linke B., Brechmann M., Süss D., Krammer P. H., Gülow K. 2010. Inhibition of NF- κ B induces a switch from CD95L-dependent to CD95L-independent and JNK-mediated apoptosis in T cells. *FEBS Letters*, 584: 4679–4688
- Köhrle K. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151: 103–119
- König B., Koch A., Spielmann J., Hilgenfeld C., Stangl G. I., Eder K. 2007. Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. *Biochemical Pharmacology*, 73: 574–585
- Koo S.-H., Flechner L., Qi L., Zhang X., Sreaton R. A., Jeffries S., Hedrick S., Xu W., al Boussouar F., Brindle P., Takemori H., Montminy M. 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437: 1109–1114
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–21
- de Kretser D. M., O'Hehir R. E., Hardy C. L., Hedger M. P. 2012. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359: 101–106
- Kuo F., Subramanian B., Kotyla T., Wilson T. A., Yoganathan S., Nicolosi R. J. 2008. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma-tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 363: 206–213
- Kushi L. H., Folsom A. R., Prineas R. J., Mink P. J., Wu Y. Bostick R. M. 1996. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 334: 1156–1162

- Kuwata T., Gongora C., Kanno Y., Sakaguchi K., Tamura T., Kanno T., Basrur V., Martinez R., Appella E., Golub T., Ozato K. 2002. Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Molecular and Cellular Biology*, 22: 7439–7448
- Lanari M. C., Hewavitharana A. K., Becu C., de Jong S. 2004. Effect of dietary tocopherols and tocotrienols on the antioxidant status and lipid stability of chicken. *Meat Science* 68: 155–162
- Landrier J.-F., Gouranton E., Reboul E., Cardinault N., El Yazidi C., Malezet-Desmoulins C., André M., Nowicki M., Souidi M. Borel P. 2010. Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21: 1207–1213
- Lauridsen C., Buckley D. J., Morrissey P. A. 1997. Influence of dietary fat and vitamin E supplementation on α -tocopherol levels and fatty acid profiles in chicken muscle membranous fractions and on susceptibility to lipid peroxidation. *Meat Science*, 46: 1–9
- Lauridsen C., Hojsgard S., Sorensen M. T. 1999. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. *Journal of Animal Science*, 7: 906–916
- Lee E., Oh E., Lee J., Sul D., Lee J. 2004. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological Sciences*, 81: 121–132
- Lee M. S., Kwun I. S., Kim Y. 2008. Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Genes & Nutrition*, 2: 327–330
- Li D., Saldeen T., Romeo F., Mehta J. L. 1999. Relative effects of α - and γ -tocopherol on low-density lipoprotein oxidation and superoxide dismutase and nitric oxide synthase activity and protein expression in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 4: 219–226
- Li C. 2006. Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *Current Opinion in Lipidology*, 17: 152–156
- Li R., Chen W., Yanes R., Lee S., Berliner J. A. 2007. OKL38 is an oxidative stress response gene stimulated by oxidized phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 48: 709–715
- Li W. J., Zhao G. P. Chen M. Q., Zheng M. Q., Wen J. 2009. Influence of dietary vitamin E supplementation on meat quality traits and gene expression related to lipid metabolism in the Beijing-you chicken. *British Poultry Science*, 50, 2: 188-198

- Lieberman M., Marks, A. 2009. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 1011 str.
- Lin J., Tarr P. T., Yang R., Rhee R., Puigserver P., Newgard C. B., Spiegelman B. M. 2003. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 30843–30848
- Lin J., Handschin C., Spiegelman B. M. 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1: 361–370
- Liu M., Wallmon A., Olsson-Martlock C., Wallin R., Saldeen T. 2003. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 700–706
- Liu Q., Yuan B., Lo K. A., Patterson H. C., Sun Q., Lodish H. F. 2012. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 109: 14568–14573
- Lu G., Xiao H., Li G.-X., Picinich S. C., Chen Y.-K., Liu A., Lee M.-J., Loy S., Yang C. S. 2010. A γ -tocopherol-rich mixture of tocopherols inhibits chemically induced lung tumorigenesis in A/J mice and xenograft tumor growth. *Carcinogenesis*, 31: 687–694
- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173: 502–511
- Machlin L. J. 1991. Vitamin E. V: Handbook of vitamins. Machlin L. J. (ed.). New York, Marcel Dekker: 99–144
- Marcil V., Seidman E., Sinett D., Boudreau F., Gendron F.-P., Ménard D., Precourt L.-P., Amre D., Levy E. 2010. Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4 α knockdown in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 40448–40460
- Maritim A. C., Sanders R. A., Watkins III J. B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17: 24–38
- Marnett L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181–182: 219–222
- McGettigan P. A. 2013. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17: 4–11
- Meydani M. 1995. Vitamin E. *The Lancet*, 345: 170–175
- Moller D. E., Berger J. B. 2003. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *International Journal of Obesity*, 27: 17–21

- Morton L. W., Ward N. C., Croft K. D., Puddey I. B. 2002. Evidence for the nitration of γ -tocopherol in vivo: 5-nitro- γ -tocopherol is elevated in the plasma of subjects with coronary heart disease. *The Biochemical Journal*, 364: 625–628
- Muir W. M., Wong G. K.-S., Zhang Y., Wang J., Groenen M. A. M., Crooijmans R. P. M. A., Megens H.-J., Zhang H., Okimoto R., Vereijken A., Jungerius A., Albers G. A. A., Lawley C. T., Delany M. E., MacEachern S., Cheng H. H. 2008. Genomic-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 105: 17312–17317
- Naidoo D., Lux O. 1998. The effect of vitamin C and E supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma. *Nutrition Research*, 18: 953–961
- Nam K.-T., Lee H.-A., Min B.-S., Kang C.-W. 1997. Influence of dietary supplementation with linseed and vitamin E on fatty acids, α -tocopherol and lipid peroxidation in muscles of broiler chicks. *Animal Feed Science Technology*, 66: 149–158
- Narciso-Gatyán C., Shin D., Sams A. R., Keeton J. T., Miller R. K., Smith S. B., Sanchez-Plata M. X. 2010. Dietary lipid source and vitamin E effect on lipid oxidation stability of refrigerated fresh and cooked chicken meat. *Poultry Science*, 89: 2726–2734
- Negishi H., Ohba Y., Yanai H., Takaoka A., Honma K., Yui K., Matsuyama T., Taniguchi T., Honda K. 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 102: 15989–15994
- Nehyba J., Hrdlicková R., Burnside J., Bose Jr H. R. 2002. A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-rel oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 22: 3942–3957
- Nguyen P., Leray V., Diez M., Serisier S., Le Bloc'h J., Siliart B., Dumon H. 2008. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92: 272–283
- Niki E. 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 1119–1124
- Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Goton N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1322–1326
- Nitto T., Dyer K. D., Czapiga M., Rosenberg H. F. 2006. Evolution and function of leukocyte RNase A ribonucleases of the avian species, *Gallus gallus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 25622–25634

- NRC (National Research Council). 1994. Nutrient requirements of poultry. Washington, D. C., National Academy Press: 155 str.
- Okamoto M., Takemori H., Katoh Y. 2004. Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15: 21–26
- O'Keefe S. F., Proudfoot G., Ackman R. G. 1995. Lipid oxidation in meats of omega-3 fatty acid-enriched broiler chickens. *Food Research International*, 2: 417–424
- Olive P. L., Ban J. P., Durand R. E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Research*, 122: 86–94
- Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E., Banath J. P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel-electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198: 259–267
- Osredkar J. Oksidativni stres. 2012. *Zdravstveni Vestnik*, 81: 393–406
- Pajk T., Rezar V., Levart A., Salobir J. 2006. Efficiency of apples, strawberries, and tomatoes for reduction of oxidative stress in pigs as a model for humans. *Nutrition*, 22: 376–384
- Pal D., Dasgupta S., Kundu R., Maitra S., Das G., Mukhopadhyay S., Ray S., Mejumdar S. S., Bhattacharya S. 2012. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine*, 18: 1279–1285
- Park P. W., Goins R. E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262–1266
- Park E. A., Mynatt R. L., Cook G. A., Kashfi K. 1995. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochemical Journal*, 310: 853–858
- Pégorier J.-P., Le May C., Girard J. 2004. Control of gene expression by fatty acids. *The Journal of Nutrition*, 134: 2444–2449
- Poljšak B., Šaput D., Milislav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Online), 2013: 1-11
- Raqib R., Cravioto A. 2009. Nutrition, immunology, and genetics: future perspectives. *Nutrition Reviews*, 6, Suppl. 2: 227–236
- Ricciarelli R., Zingg J.-M., Azzi A. 2000. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*, 102: 82–87

- Rimbach G., Fischer A., Stoecklin E., Barella L. 2004. Modulation of hepatic gene expression by α -tocopherol in cultured cells and in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031: 102–108
- Rochfort S. 2005. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*, 68: 1813–1820
- Rota C., Barella L., Minihane A.-M., Stöcklin E., Rimbach G. 2004. Dietary alpha-tocopherol affects differential gene expression in rat testes. *Life*, 56: 277–280
- Rota C., Rimbach G., Minihane A.-M., Stoecklin E., Barella L. 2005. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: Potential implications for its neuroprotective properties. *Nutritional Neuroscience*, 8: 21–29
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365–386
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: *Antioksidanti v živilstvu*. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39–51
- Ruiz J. A., Guerrero L., Arnau J., Guardia M. D., Esteve-Garcia E. 2001. Descriptive sensory analysis of meat from broilers fed diets containing vitamin E or β -carotene as antioxidants and different supplemental fats. *Poultry Science*, 80: 976–982
- Rupérez F. J., Martín D., Herrera E., Barbas C. 2001. Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935: 45–69
- Saldeen K., Saldeen T. 2005. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25: 877–889
- Saldeen T., Li D., Mehta J. L. 1999. Differential effects of α - and γ -tocopherol on low density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*, 34: 1208–1215
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živiljih – vpliv na zdravje. V: *Antioksidanti v živilstvu*. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287–294
- Sampath H., Ntambi J. M. 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutrition Reviews*, 62: 333–339
- Seifried H. E., Anderson D. E., Fisher E. I., Milner J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 18: 567–579

- Shigenaga M., Lee H. H., Blount B. C., Christen S., Shigeno E. T., Yip H., Ames B. N. 1997. Inflammation and NO_x-induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 94: 3211–3216
- Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 189: 1777–1782
- Shin D. J., Osborne T. F. 2003. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2). *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 34114–34118
- Sies H. 1997. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology*, 82: 291–295
- Simopoulos A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 438–463
- Simopoulos A. P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 560–569
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184–191
- Singh N. P. 1997. Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375: 195–203
- Siriwardhana N., Kalupahana N. S., Cekanova M., LeMieux M., Greer B., Moustaid-Moussa N. 2013. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 613–623
- Song S., Attia R. R., Connaughton S., Niesen M. I., Ness G. C., Elam M. B., Hori R. T., Cook G. A., Park E. A. 2010. Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and PPAR gamma coactivator (PGC-1 α) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 325: 54–63
- Sontag T. J., Parker R. S. 2002. Cytochrome P450 ω -hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 25290–25296
- Souci S. W., Fachmann W., Kraut H. 2008. Food composition and nutrition tables. 7th edition. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, Taylor&Francis a CRC Press Book: 1364 str.

- Spielbauer B., Stahl F. 2005. Review. Impact of microarray technology in nutrition and food research. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 908–917
- Sugden M. C., Bulmer K., Gibbons G. F., Knight B. L., Holness M. J. 2002. Peroxisome-proliferator-activated receptor- α (PPAR α) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochemical Journal*, 364: 361–368
- Sugiyama E., Ishikawa Y., Li Y., Kagai T., Nobayashi M., Tanaka N., Kamijo Y., Yokoyama S., Hara A., Aoyama T. 2008. Eicosapentaenoic acid lowers plasma and liver cholesterol levels in the presence of peroxisome proliferators-activated receptor alpha. *Life Sciences*, 83: 19–28
- Sun C., Wei Z., Li Y. 2011. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Molecular Biology Reports*, 38: 731–737
- Surai P. F., Sparks N. H. C. 2000. Tissue-specific fatty acid and α -tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poultry Science* 79: 1132–1142
- Tanaka N., Kawakami T., Taniguchi T. 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 4531–4540
- Teupser D., Thiery J., Seidel D. 1999. α -Tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages. *Atherosclerosis*, 144: 109–115
- Theodosiou A., Ashworth A. 2002. MAP kinase phosphatases. *Genome Biology*, 3: 1–10
- Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil J. L., Holden H. M. 2001. Human UDP-galactose 4-epimerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 15131–15136
- Tomasch R., Wagner K.-H., Elmadfa I. 2001. Antioxidative power of plant oils in humans: the influence of α - and γ -tocopherol. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 45: 110–115
- Traber M. G., Kayden H. J. 1989. Preferential incorporation of α -tocopherol vs γ -tocopherol in human lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49: 517–526
- Valastyan S., Thakur V., Johnson A., Kumar K., Manor D. 2008. Novel transcriptional activities of vitamin E: inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochemistry*, 47: 744–752

- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 7: 1–11
- Vilà B., Jaradat Z. W., Marquardt R. R., Frohlich A. A. 2002. Effect of T-2 toxin on in vivo lipid peroxidation and vitamin E status in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 479–486
- Villaverde C., Baucells M. D., Manzanilla E. G., Barroeta A. C. 2008. High levels of dietary unsaturated fat decrease α -tocopherol content of whole body, liver, and plasma of chickens without variations in intestinal apparent absorption. *Poultry Science*, 87: 497–505
- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemeč M., Salobir J. 2011. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of α -tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. *Poultry Science*, 90: 1478–1488
- Vorachek W. R., Pearson W. R., Rule G. S. 1991. Cloning, expression, and characterization of a class-mu glutathione transferase from human muscle, the product of the GST4 locus. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA*, 88: 4443–4447
- Vossen E., Ntawubizi M., Raes K., Smet K., Huyghebaert G., Arnouts S., De Smet S. 2011. Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plasma in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95: 198–205
- Wagner K.-H., Kamal-Eldin A., Elmadfa I. 2004. Gamma-tocopherol – an underestimated vitamin? *Annals of Nutrition & Metabolism*, 48: 169–188
- Wagner J. G., Jiang Q., Harkema J. R., Ames B. N., Illek B., Roubey R. A., Peden D. B. 2007. γ -Tocopherol prevents airway eosinophilia and mucous cell hyperplasia in experimentally induced allergic rhinitis and asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 501–511
- Whitbread A. K., Masoumi A., Tetlow N., Schmuck E., Coggan M., Board P. G. 2005. Characterization of the Omega class of glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401: 78–99
- Wiser J., Alexis N. E., Jiang Q., Wu W., Robinette C., Roubey R., Peden D. B. 2008. In vivo γ -tocopherol supplementation decreases systemic oxidative stress and cytokine responses of human monocytes in normal and asthmatic subjects, *Free Radical Biology & Medicine*, 45: 40–49
- Wong S. H. Y., Knight J. A., Hopfer S. M., Zaharia O., Leach C. N., Sunderman F. W. J. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde – thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33: 214–220

- Wood J. D., Richardson R. I., Nute G. R., Fisher A. V., Campo M. M., Kasapidou E., Sheard P. R., Enser M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66: 21–32
- Woods W. B., Fearon A. M. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*, 126: 1–20
- Wu J. H. Y., Ward N. C., Indrawan A. P., Almeida C. A., Hodgson J. M., Proudfoot J. M., Puddey I. B., Croft K. D. 2007. Effects of α -tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*, 53: 511–519
- Wu M., Bian Q., Liu Y., Fernandes A. F., Taylor A., Pereira P., Shang F. 2009. Sustained oxidative stress inhibits NF- κ B activation partially via inactivating the proteasome. *Free Radical Biology & Medicine*, 46: 62–69
- Xiao R., Power R. F., Mallone D., Crowdus C., Brennan K. M., Ao T., Pierce J. L., Dawson K. A. 2011. A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae-based antioxidant in broiler diets. *Poultry Science*, 90: 136–146
- Yamashita K., Nohara Y., Katayama K., Namiki M. 1992. Sesame seed lignans and γ -tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats. *The Journal of Nutrition*, 122: 2440–2446
- Yasin M., Asghar A., Anjum F. M., Butt M. S., Khan M. I., Arshad M. S., Shahid M., El-Ghorab A. H., Shibamoto T. 2012. Oxidative stability enhancement of broiler bird meats with α -lipoic acid and α -tocopherol acetate supplemented feed. *Food Chemistry*, 131: 768–773
- Yeum K.-J., Russell R. M., Krinsky N. I., Aldini G. 2004. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430: 97–103
- Yoon J. C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Ronald Kahn C., Granner D. K., Newgard C. B., Spiegelman B. M. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413: 131–138
- Yoon Y.-S., Seo W.-Y., Lee M.-W., Kim S.-T., Koo S.-H. 2009. Salt-inducible Kinase Regulates Hepatic Lipogenesis by Controlling SREBP-1c Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 10446–10452
- Yoshikawa T., Terasawa N., Manabe H., Terasawa Y., Takemura T., Kondo, M. 1998. α -Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors*, 7: 15–19

- Yu W., Park S.-K., Jia L., Tiwary R., Scott W. W., Li J., Wang P., Simmons-Menchaca M., Sanders B. G., Kline, K. 2008. RRR- γ -tocopherol induces human breast cancer cells to undergo apoptosis via death receptor 5 (DR5)-mediated apoptotic signaling. *Cancer Letters*, 259: 165–176
- Zhang Y., Ma K., Song S., Elam M. B., Cook G. A., Park E. A. 2004. Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I α). *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 53963–53971
- Zhang X. H., Zhong X., Zhou Y. M., Du H. M., Wang T. 2009. Effect of RRR- α -tocopherol succinate on the growth and immunity in broilers. *Poultry Science*, 88: 959–966
- Zingg J.-M., Azzi A. 2004. Non-Antioxidant Activities of Vitamin E. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1113–1133

ZAHVALA

Ob zaključku doktorskega študija bi se rada zahvalila vsem, ki so mi bili v času nastajanja v oporo.

Najprej hvala mentorju prof. dr. Janezu Salobirju, ki mi je dal možnost, da raziskujem na področju prehrane, saj me to področje zanima že iz začetkov študijskih let. Hvala za vse napotke, za podporo in razumevanje. Sodelovanje z njim mi je bilo v čast in veliko veselje.

Prof. dr. Simonu Horvatu se zahvaljujem za pomoč pri nutrigenomskem delu naloge. Naloga je prva take vrste na Katedri za prehrano, zato je bilo potrebno kar precej dela za osvojitve potrebnega znanja in veščin. Hvala za vsa navodila, razlago, pomoč pri organizaciji poti na Škotsko,...

Zahvaljujem se prof. dr. Marjanu Simčiču in izr. prof. dr. Borutu Poljšaku za hiter in strokoven pregled naloge.

Hvala dr. Roku Keburu za izvedbo RT-qPCR, Vesni Mrak za izris toplotnih grafov in Daši Jevšinek Skok za izris Vennovih diagramov.

Za pregled naloge in napotke pri oblikovnem delu se zahvaljujem dr. Nataši Siard.

Hvala vsem sodelavcem na Katedri za prehrano, ki so zaslužni za to, da mi v treh letih in pol, ki sem jih na Rodici preživela kot mlada raziskovalka, nikoli ni bilo težko priti v službo. Največja zasluga za dobro vzdušje gre prof. dr. Janezu Salobirju, saj ga je brez dobrega šefa težko doseči. Hvala vsem za pomoč pri poskusu in laboratorijskem delu, za razumevanje in prijateljstvo. Hvala Mojci, Tamari, Tini, Alenki, Vidi, Anici, Marku, Mojci, Nadi, Ajdi, Tatjani, Andreju, Igorju in Petru.

Hvala tudi novim sodelavcem na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Na koncu hvala bližnjim za vso pomoč in razumevanje. Hvala staršem, brez vajine pomoči bi težko krmarila skozi življenje, hvala sestrama, ki sta hkrati moji najboljši prijateljici. Hvala Daretu, Gašperju, Klari in Maruši, ker me imate radi in ker ste morali v tem času tudi malo potrpeti, ko mame ni bilo doma.

PRILOGE

Priloga A: Seznam oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih pri RT-qPCR
Annex A: The list of primers used in quantitative RT-PCR

Gen	Access number (mRNA)	Smiselni začetni oligonukleotid (5'-3')	Dolžina pomnoženih fragmentov (bp)	Učinkovitost začetnega oligonukleotida
<i>AOC3</i>	XM_418136	TCTGGGTGCTAACACCTTCC GTGAGTGGGAAGTCTGGAT	184	1,71
<i>COQ10B</i>	XM_421913	GGACGTGTACCTTGGATTTTG CCATCTGCTTTACCACTTCATC	99	1,99
<i>DIO3</i>	NM_0011226 48	GCCTGCATCCTCCTCTTTC TCAGCATCTTCTTGCGAATG	88	1,70
<i>DUSP16</i>	XM_428887	CATTCAGCATTTCAGCAAAACA TCAGGTGAGAGAGAGGTCACA	99	2,00
<i>FST</i>	NM_205200	GATGAGCTCTGCCCTGAAAG CTTCTTCCTCTGGGTCTTCG	169	1,88
<i>GALE</i>	XM_0012337 81	ACACATCGCTGCTTTGAAGA CATCTGCAGGACAGAGTAGCC	164	1,99
<i>HMGCL</i>	XM_417834	TGGTGTGAGTTACCCAGTGC ATGCTGCTCCAAAGATGGAC	95	2,00
<i>OSGIN1</i>	XM_414073	AAGAGGCAGTGGATGTGTCC CACAGGGCTGTTGGATCTTC	83	2,00
<i>PDK4</i>	XM_418671	CAGCTACTGCAGGTTGAAGC AAAGCTGCTATTTGCAAGCAC	102	2,00
<i>PIK3R1</i>	XM_0012322 35	TAAGGGATGCCATTTGTTCC CCCTTAACGAAGCCCTAAGC	168	1,83
<i>SIK1</i>	NM_204682	AGCGACTCTGCCTTCAGTTC TGATCCACGGCATTAAACA	98	1,81
<i>EIF2A</i>	NM_0010313 23	CATGAAGCAAAGAAAGCTGCTA TCGTGGTGTATTCTGTGATGC	90	1,80
<i>PPIB</i>	NM_205461	GTGGAGAACTTCGTGGCTTT CCTCCCTGGATCATGAAGTC	98	1,91
<i>RPLA</i>	NM_0010079 67	TTATGCCATCTGTTCTGCC GCGATTCTCATCTTACCCT	235	1,82
<i>RPLP0</i>	NM_204987	GGGCACCTGGAGAACAAC GGTCAGATCCTCCTTGGTGA	98	2,00