

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina TREBUŠAK

**VPLIV NEKATERIH NARAVNIH PREHRANSKIH
DODATKOV NA OKSIDACIJSKI STRES IN
HISTOLOŠKO ZGRADBO PREBAVIL PRI KUNCIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina TREBUŠAK

**VPLIV NEKATERIH NARAVNIH PREHRANSKIH DODATKOV NA
OKSIDACIJSKI STRES IN HISTOLOŠKO ZGRADBO PREBAVIL
PRI KUNCIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF DIFFERENT NATURAL DIETARY
SUPPLEMENTS ON OXIDATIVE STRESS AND HISTOLOGICAL
STRUCTURE OF GASTROINTESTINAL TRACT OF RABBITS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 27. 9. 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod (nima opravljenega magisterija) na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja zootehnike. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Tatjana Pirman.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: prof. dr. Milka VRECL
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora: 21.5.2014

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

Tina Trebušak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 636.92.084/.087(043.3)=163.6
KG	kunci/prehrana živali/prehranski dodatki/oksidacijski stres/prebavila/histologija
KK	AGRIS L51/5600
AV	TREBUŠAK, Tina, univ. dipl. inž. zoot.
SA	PIRMAN, Tatjana (mentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje zootehnike
LI	2014
IN	VPLIV NEKATERIH NARAVNIH PREHRANSKIH DODATKOV NA OKSIDACIJSKI STRES IN HISTOLOŠKO ZGRADBO PREBAVIL PRI KUNCIH
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 86 str., 23 pregl., 12 sl., 179 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V raziskavi smo proučevali vpliv dveh naravnih prehranskih dodatkov, gobe svetlikava pološčenka, imenovane tudi reiši (<i>Ganoderma lucidum</i>), in oljčnih listov na oksidacijski stres <i>in vivo</i>, oksidacijsko stabilnost mesa in histološko zgradbo prebavil pri kuncih. V žičnate kletke smo individualno naselili 48 kuncev in jih razdelili v štiri skupine po 12 živali. Negativna kontrolna skupina (KONT -) je v krmi dobivala 6 % palmove masti, pozitivna kontrolna skupina (KONT +) in ostale poskusne skupine pa 6 % lanenega olja. V krmo kontrolnih skupin nismo dodali dodatkov, pri ostalih dveh skupinah smo dodali 1 % gobe reiši v obliki pripravka Galimmun® (GOBE) ali 1 % oljčnih listov (OLJKE). Za merjenje kazalnikov oksidacijskega stresa smo v zadnjem tednu poskusa zbrali vzorce seča in na koncu 22-dnevnega poskusnega obdobja živalim odvzeli vzorce krvi, jeter, prebavil in po 24-urnem hlajenju trupov še vzorce abdominalne maščobe ter hrbtne in stegenske mišice. Obseg oksidacijskega stresa smo določili z merjenjem poškodb DNA levkocitov in vsebnostjo produktov oksidacije maščob (MDA) v seču, plazmi, jetrih in mišicah. Določili smo tudi maščobnokislinsko sestavo mišic, jeter in maščobnega tkiva ter vsebnost vitamina E v plazmi, jetrih in obeh mišicah. Oksidacijsko stabilnost mesa smo ovrednotili z merjenjem MDA v mesu, obdelanem na različne načine. Izmerili smo tudi pH vrednost in barvo mesa. Z merjenjem višine črevesnih resic in globine intestinalnih žlez smo ocenili histološko zgradbo tankega in slepega črevesa in določili antioksidacijsko kapaciteto v tkivu in vsebini tankega črevesa. Dodatka gob ali oljčnih listov nista vplivala na zmanjšanje oksidacijskega stresa <i>in vivo</i> in tudi nista značilno izboljšala oksidacijske stabilnosti mesa. Prav tako nista imela vpliva na histološko zgradbo prebavil. Rezultati so sicer pokazali določen pozitiven vpliv na izboljševanje oksidacijske stabilnosti mesa, kar bi mogoče lahko izboljšali z večjim deležem oziroma z drugačno obliko (ekstrakt) dodanih naravnih dodatkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 636.92.084/.087(043.3)=163.6
CX rabbits/animal nutrition/dietary supplements/oxidative stress/gastrointestinal tract/histology
CC AGRIS L51/5600
AU TREBUŠAK, Tina
AA PIRMAN, Tatjana (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Animal Production
PY 2014
TI THE EFFECT OF DIFFERENT NATURAL DIETARY SUPPLEMENTS ON OXIDATIVE STRESS AND HISTOLOGICAL STRUCTURE OF GASTROINTESTINAL TRACT OF RABBITS
DT Doctoral Dissertation
NO XI, 86 p., 23 tab., 12 fig., 179 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The objective of this study was to evaluate the effect of two natural dietary supplements, mushroom Svetlikava pološčanka (Ling Zhi) also called Reishi (*Ganoderma lucidum*) and olive leaves on oxidative stress *in vivo*, oxidative stability of meat and histological structure of gastrointestinal tract in rabbits. Forty-eight SIKA rabbits were individually caged and divided into four groups of 12 animals. The negative control group (KONT -) received diet with 6% of palm fat, the positive control group (KONT +) and all other groups received diet with 6% of linseed oil. The diet of control groups was un-supplemented, while other two diets were supplemented with 1% of mushroom Reishi in the form of preparation Galimmun[®] (GOBE) or 1% of olive leaves (OLJKE). In the last week of the experiment, urine samples were collected and at the end of 22-days of experimental period the blood, liver and gastrointestinal tract samples were collected. After 24-h of chilling, carcass samples of abdominal fat, back and leg muscles were obtained. Oxidative stress was determined by measuring leukocytes' DNA damage and malondialdehyde (MDA) concentration in urine, plasma, liver and muscles. The fatty acid composition of the muscles, liver and adipose tissue and the content of vitamin E in plasma, liver and muscles were also determined. The oxidative stability of meat was measured by MDA in differently processed meat together with pH and colour determination. The histological structure of small intestine and caecum were evaluated by measuring height of intestinal villi and depth of intestinal crypts. The antioxidant capacity of lipid and water soluble compounds in tissue and small intestinal content were also measured. Dietary supplements, mushrooms or olive leaves did not reduce oxidative stress *in vivo* and also did not significantly improve oxidative stability of fresh meat. There was also no influence on the histological structure of gastrointestinal tract. The supplements improved oxidative stability of stored n-3 rich meat to limited extent. From the obtained results we assume that supplements should be included in higher amounts or in different form (extract) to assure oxidative stability of n-3 rich rabbit meat.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key word documentation (KDW)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OKSIDACIJSKI STRES	4
2.1.1 Prosti radikali in antioksidanti	4
2.1.2 Oksidacijski stres pri domačih živalih	6
2.2 NARAVNI DODATKI	7
2.2.1 Svetlikava pološčenka (<i>Ganoderma lucidum</i>) ali reiši	8
2.2.2 Oljčni listi	10
2.3 MESO KOT FUNKCIONALNO ŽIVILO	12
2.3.1 Maščobne kisline in maščobnokislinska sestava mesa	13
2.4 PREBAVNI SISTEM PRI KUNCIH	17
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 PREHRANSKI POSKUS	20
3.1.1 Krma	20
3.1.1.1 Sestava uporabljenih krmnih dodatkov	21
3.1.1.2 Sestava poskusnih krmnih mešanic	22
3.1.2 Živali	25
3.1.3 Odvzem in zbiranje vzorcev	26
3.1.3.1 Seč	26
3.1.3.2 Kri	26
3.1.3.3 Vzorci jeter in prebavil	27
3.1.3.4 Vzorci mišic in maščobe	27

3.2	DOLOČANJE POŠKODB DNA LEVKOCITOV – KOMETNI TEST	29
3.2.1	Izolacija mononuklearnih celic iz krvi	29
3.2.2	Postopek kometnega testa	30
3.2.2.1	Priprava minigelov na mikroskopskih objektivih	30
3.2.2.2	Alkalna liza celic	31
3.2.2.3	Odvijanje superzvite DNA v elektroforetskem pufu	31
3.2.2.4	Nevtralizacija	31
3.2.2.5	Barvanje jedrne DNA z etidijevim bromidom (EtBr) in spiranje	31
3.2.2.6	Analiza signalov in ocenjevanje poškodb celic	31
3.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA	33
3.3.1	Določanje koncentracije MDA v plazmi in seču	33
3.3.2	Določanje koncentracije MDA v jetrih, mišicah in mesu	34
3.3.3	Analiza vzorcev s tehniko HPLC	34
3.4	DOLOČANJE KONCENTRACIJE VITAMINA E	36
3.4.1	Priprava vzorcev krvne plazme	36
3.4.2	Priprava vzorcev jeter in mišic	36
3.4.3	Analiza vzorcev s tehniko HPLC	37
3.5	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA	38
3.5.1	Priprava vzorcev	38
3.5.2	Analiza maščobnokislinske sestave s plinsko kromatografijo	39
3.6	MERJENJE BARVE IN pH VREDNOSTI MESA	39
3.7	PREBAVILA	39
3.7.1	Histološka zgradba prebavil	39
3.7.1.1	Priprava tkivnih rezin	39
3.7.1.2	Morfometrična analiza črevesnih resic in intestinalnih žlez	40
3.7.2	Antioksidacijska kapaciteta v maščobah in v vodi topnih antioksidantov	40
3.7.2.1	Priprava vzorcev tkiva in vsebine tankega črevesa	41
3.7.2.2	Določanje antioksidacijske kapacitete	41
3.8	STATISTIČNA ODBELAVA PODATKOV	43
4	REZULTATI	44
4.1	PROIZVODNI REZULTATI	44
4.2	STOPNJA POŠKODB DNA LEVKOCITOV	44

4.3	KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA	45
4.3.1	Koncentracija MDA v seču, plazmi, jetrih in mišicah	45
4.3.2	Koncentracija MDA v mesu, obdelanem na različne načine	45
4.4	KONCENTRACIJA VITAMINA E	46
4.5	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA	47
4.6	BARVA IN pH VREDNOST MESA	52
4.7	PREBAVILA	53
4.7.1	Histologija prebavil	53
4.7.2	Antioksidacijska kapaciteta prebavil	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	55
5.1	RAZPRAVA	55
5.1.1	Maščobnokislinska sestava in splošni oksidacijski status organizma	57
5.1.2	Maščobnokislinska sestava in oksidacijska stabilnost mesa	59
5.1.3	Prebavila	64
5.2	SKLEPI	66
6	POVZETEK (SUMMARY)	67
6.1	POVZETEK	67
6.2	SUMMARY	69
7	VIRI	71
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin z 18 ogljikovimi atomi v nekaterih prehransko pomembnih rastlinskih oljih in lanenem semenu (g/100 g) (Souci in sod., 2008)	14
Preglednica 2: Kemijska sestava (%) in energijska vrednost mesa (kJ) (Dalle Zotte, 2002)	15
Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava in vsebnost holesterola v mesu (mg/100 g) (Golob in sod., 2006)	16
Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava in vsebnost tokoferolov v palmovi masti in lanenem olju	21
Preglednica 5: <i>In vitro</i> antioksidacijski potencial, koncentracija vitamina E in kemijska sestava uporabljenih krmnih dodatkov	22
Preglednica 6: Sestava poskusnih krmnih mešanic (g/kg krmne mešanice)	23
Preglednica 7: Sestava premiksa (g/kg)	24
Preglednica 8: Kemijska analiza poskusnih krmnih mešanic	25
Preglednica 9: Povprečna telesna masa kuncev ob uhlevitvi in na začetku poskusnega obdobja (g)	26
Preglednica 10: Shema pipetiranja pri določevanju v maščobah topnih antioksidantov	42
Preglednica 11: Shema pipetiranja pri določevanju v vodi topnih antioksidantov	42
Preglednica 12: Proizvodni rezultati kuncev iz različnih poskusnih skupin	44
Preglednica 13: Poškodbe DNA levkocitov, predstavljene kot OTM (repni moment po Olivu) in kot % DNA v repu kometa	44
Preglednica 14: Vsebnost malondialdehida v vzorcih seča, plazme, jeter in obeh mišic pri kuncih iz različnih poskusnih skupin	45
Preglednica 15: Koncentracija MDA (nmol/g) v vzorcih mesa obdelanih na različne načine	46
Preglednica 16: Vsebnost tokoferolov v plazmi, jetrih, hrbtni in stegenski mišici pri kuncih iz različnih poskusnih skupin	47

Preglednica 17:	Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava hrbtne mišice (% od vseh MK)	48
Preglednica 18:	Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava stegenske mišice (% od vseh MK)	49
Preglednica 19:	Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava jeter (% od vseh MK)	50
Preglednica 20:	Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava maščobe (% od vseh MK)	51
Preglednica 21:	Barva mesa, izražena kot vrednosti CIE za svetel (L^*), rdeč (a^*) in rumen (b^*) odtenek, ter pH vrednosti mesa	52
Preglednica 22:	Višina črevesnih resic (μm), globina intestinalnih žlez (μm) in njuno razmerje na različnih delih tankega črevesa in globina intestinalnih žlez v slepem črevesu (μm)	53
Preglednica 23:	Antioksidacijska kapaciteta v maščobah (ACL) in v vodi (ACW) topnih antioksidantov v tkivu in vsebini tankega črevesa	54

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Svetlikava pološčenka (<i>Ganoderma lucidum</i>) oziroma reiši (foto: Vida Rezar)	8
Slika 2: Oljka (<i>Olea europaea</i>) (foto: Vida Rezar)	10
Slika 3: Struktura oleuropeina in njegovih derivatov (Al-Azzawie in Alhamdani, 2006)	11
Slika 4: Prebavni organi kunca (Grün, 2002)	17
Slika 5: Prečni prerez črevesne stene (Sklan, 2004)	18
Slika 6: Anatomska lokacija odvzetih vzorcev mišic (Hulot in Ouhayoun, 1999)	28
Slika 7: Primeri različno poškodovanih jedrnih DNA levkocitov	32
Slika 8: Primer jedrne DNA levkocita, vidne s postopkom kometnega testa	32
Slika 9: Primer kromatograma določitve MDA v vzorcih mesa iz vseh poskusnih skupin	35
Slika 10: Primer kromatograma določitve tokoferolov v vzorcu plazme iz skupine OLJKE in standarda	38
Slika 11: Primer tkivnih rezin dvanajstnika in vitega črevesa	40
Slika 12: Koncentracija MDA (nmol/g) v vzorcih mesa, obdelanih na različne načine	61

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACL	antioksidacijska kapaciteta v maščobah topnih spojin
ACW	antioksidacijska kapaciteta v vodi topnih spojin
BHA	butilirani hidroksi anisol
BHT	butilirani hidroksi toluen
CoQ ₁₀	koencim Q10
DHA	dokozaheksaenojska kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPA	dokozapentaenojska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
EPA	eikozapentaenojska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MDA	malondialdehid
MK	maščobna kislina
NMK	nasičene maščobne kisline
OTM	repni moment po Olivu
PBS	fosfatni pufer z NaCl
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SEM	standardna napaka povprečja
TBA	tiobarbiturna kislina
TCA	triklorocetna kislina
TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropan
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

Dandanes je živinoreja vedno bolj intenzivna, zaradi česar so tudi domače živali vse bolj izpostavljene različnim stresnim dejavnikom. Eden glavnih je oksidacijski stres. Prehrana živali ima nanj zelo velik vpliv, saj lahko krma vsebuje prevelike količine prooksidantov ali na drugi strani premajhne količine antioksidantov. Ko se v organizmu poruši razmerje med prooksidanti in antioksidanti, pride do povečane tvorbe prostih radikalov, kar vodi do razvoja mnogih bolezni in oksidacijskih sprememb pomembnih bioloških molekul, vključno z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, maščobami in DNA.

V intenzivni reji so živali izpostavljene oksidacijskemu stresu predvsem zaradi dodajanja velikih količin rastlinskih maščob v njihovo prehrano. Te vključujemo, da bi pokrili energijske potrebe živali, poleg tega pa je trenutno zelo aktualno večje vključevanje večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) v krmo, z namenom pridobivanja funkcionalnih proizvodov za prehrano ljudi. S krmo, bogato z n-3 VNMK, dobimo proizvode, kot so npr. z n-3 obogatena jajca ali z n-3 obogateno meso. Pri tem se seveda delež teh kislin ne poveča samo v proizvodih, ampak tudi v vseh ostalih tkivih in plazmi, kar poveča občutljivost celotnega organizma za oksidacijo. To nas je pripeljalo do novih izzivov, kako živali ohraniti zdrave, njihove proizvode pa oksidacijsko stabilne in primerne za nadaljnjo predelavo. Z vključevanjem primernih količin antioksidantov v krmo za živali lahko poskrbimo za zaščito organizma in oksidacijsko stabilnost živalskih proizvodov.

Vitamin E (α -tokoferol) je najpogosteje uporabljen antioksidant. Vse bolj pa se zaradi vedno večje ozaveščenosti porabnikov pojavlja zahteva po uporabi naravnih antioksidantov, kot so različni rastlinski izvlečki. Te so že stoletja tradicionalno uporabljali za izboljšanje senzoričnih značilnosti ter podaljševanja roka uporabnosti hrane. Med naravne antioksidante rastlinskega izvora, ki so predmet novejših raziskav, prištevamo različne polifenole in karotenoide. Polifenoli, predvsem flavonoidi, so zelo zanimivi kot naravni antioksidanti, saj so zastopani v širokem spektru rastlin in preko različnih mehanizmov delujejo kot antioksidanti.

Zdravilne gobe že stoletja uporabljajo v tradicionalni medicini, predvsem na področju Azije. Poznane so po svojih zdravilnih učinkih, kot so antitumorni, antibakterijski, antivirusni, hematološki in imunomodulatorni. Tako celične komponente kot tudi sekundarni metaboliti gob so pokazali vpliv na imunski sistem in jih lahko uporabljamo pri zdravljenju različnih bolezni (Ferreira in sod., 2007). So dober vir kakovostnih beljakovin, vsebujejo veliko vlaknin in nenasičenih maščobnih kislin, bogate so z vitamini in rudninskimi snovmi, mnoge študije pa dokazujejo, da vsebujejo številne potencialne naravne antioksidante (Lindequist in sod., 2005), ki lahko nevtralizirajo proste radikale in tako preprečujejo pojav oksidacijskega stresa, s tem poškodbe pomembnih bioloških molekul ter pojav žilnih in rakavih obolenj. Zdravilne gobe so dober vir fenolov,

flavonoidov, karotenov in askorbinske kisline, ki so znani antioksidanti (Froufe in sod., 2009) imajo pa tudi protivnetne učinke oziroma stimulirajo imunski sistem (Johnson in sod., 2009) in antibakterijske učinke (Hearst in sod., 2009), kar je zaradi pogostih prebavnih motenj in poginov pri kuncih zelo pomembno.

V Evropi, predvsem na področju Sredozemlja, je v ljudskem zdravilstvu že od nekdaj pomembna oljka, ki jo danes najbolj poznamo po namiznih oljkah in oljčnem olju. Oljka je dobro odporna proti mikroorganizmom in insektom (Kubo in sod., 1995), njene liste pa uporabljajo kot zdravilo pri vročini in različnih boleznih, kot je malarija (Benavente-García in sod., 2000). Oljčni listi kot ostanki pri pobiranju oljk za predelavo v oljčno olje predstavljajo približno 10 % skupne mase zbranega materiala. Oljčni listi in njihovi ekstrakti so bogat vir fenolnih spojin, kot sta olevuropein in hidroksitirozol, in vitamina E (Paiva-Martins in sod., 2009). Zaradi visoke vsebnosti fenolnih spojin so oljčni listi poznani po antioksidacijskem delovanju. Prav tako oljčni listi uspešno zavirajo razvoj mikroorganizmov in bakterij, zato so primeren dodatek v krmo za izboljšanje kakovosti mesa (Paiva-Martins in sod., 2009), izboljšajo oksidacijsko stabilnost mesa in zavirajo lipidno oksidacijo, vendar v manjši meri kot dodatek vitamina E (Botsoglou in sod., 2010).

Kunčje meso je zaradi svojih lastnosti vse bolj iskano, saj ima nizko vsebnost maščob in je bogat vir beljakovin, rudninskih snovi in vitaminov. Ugodni maščobnokislinsko sestavo mesa lahko še izboljšamo z ustrezno prehrano kuncev, bogato z VNМК in pridobimo t.i. funkcionalno živilo za prehrano ljudi. Pri tem pa moramo biti pozorni na zdravstveno stanje kuncev, ki so na spremembo prehrane zelo občutljivi. Pri reji kuncev se namreč pogosto srečujemo z velikimi izgubami živali, predvsem zaradi prebavnih motenj oziroma drisk, kar bi lahko preprečili ali vsaj omejili z ustreznimi prehranskimi dodatki.

V naši prehranski raziskavi smo želeli proučiti učinek dodatka zdravilne gobe svetlikava pološčenka in oljčnih listov kot potencialnih virov naravnih antioksidantov na oksidacijski stres pri kuncih, ki smo ga povzročili s povečanim deležem VNМК v obroku. Zanimalo nas je, ali lahko z dodatkom omenjenih naravnih dodatkov povečamo oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa, ki ima lastnosti funkcionalnega živila zaradi povečane vsebnosti n-3 VNМК in je zato podvrženo oksidaciji in s tem zmanjšanju prehranske in senzorične vrednosti. Poleg tega smo spremljali stopnjo oksidacijskega stresa *in vivo* in vpliv na histološko zgradbo prebavil kuncev.

Namen raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:

- Dodatek n-3 VNMK v krmo kuncev spremeni maščobnokislinsko sestavo mesa, poveča oksidacijski stres in zmanjša oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa.
- Dodatek n-3 VNMK v krmo kuncev vpliva na histološko zgradbo prebavil pri kuncih.
- Dodatek zdravilnih gob ali oljčnih listov odpravi ali vsaj zmanjša lipidno oksidacijo *in vivo*, povzročeno s povečanim zauživanjem VNMK, in tako poveča zaščito organizma pred oksidacijo (zmanjšanje tvorbe toksičnih aldehydov in zmanjšanje oksidacijskih poškodb DNA levkocitov).
- Dodatek zdravilnih gob ali oljčnih listov izboljša oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa.
- Dodatek zdravilnih gob ali oljčnih listov izboljša histološko zgradbo prebavil pri kuncih.

Rezultati raziskave naj bi:

- prispevali k poznavanju delovanja testiranih naravnih dodatkov pri zmanjševanju oksidacijskega stresa,
- potrdili ali ovrgli učinkovitost testiranih naravnih dodatkov pri povečevanju zaščite organizma kuncev pred oksidacijo,
- potrdili ali ovrgli učinkovitost testiranih naravnih dodatkov pri ohranjanju oksidacijske stabilnosti kunčjega mesa,
- potrdili ali ovrgli učinkovitost testiranih naravnih dodatkov za izboljšanje histološke zgradbe prebavil pri kuncih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJSKI STRES

Vsak organizem, tako človeški kot tudi živalski in rastlinski, je izpostavljen vplivom različnih oblik stresa. Ta je lahko fizičen, psihičen ali kemičen, vsem pa je skupno, da lahko negativno vplivajo na organizem. Oksidacijski stres je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine potencialno škodljivih dejavnikov, t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti – ROS (angl. reactive oxygen species). Te spojine v majhnih količinah nastajajo že pri normalnih presnovnih procesih, pri sintezi nekaterih hormonov, proizvajajo pa jih tudi nekatere vrste levkocitov kot orožje za uničenje bakterij, kar zagotavlja pomemben obrambni mehanizem pred okužbami. Oksidacijski stres je definiran kot neravnovesje med prooksidanti (prosti radikali, ROS) in antioksidanti v prid prooksidantov (Sies, 1997). Do premika ravnotežja na stran prooksidantov lahko pride, če se zmanjša antioksidacijska zaščita organizma ali se poveča nastajanje prostih radikalov. V pogojih oksidacijskega stresa pride do porasta ROS v organizmu ali tkivih, kar lahko povzroči obsežne poškodbe bioloških molekul, vključno z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, maščobami in DNA (Halliwell, 1996; Valko in sod., 2007). Poškodbe DNA vodijo do mutacij, z oksidacijo beljakovine izgubljajo svojo funkcijo, maščobe pa podležejo lipidni peroksidaciji, katere končni produkti so reaktivni aldehidi. S povečanim zauživanjem antioksidantov lahko zmanjšamo oksidacijski stres in s tem vzpostavimo ravnotežje med prooksidanti in antioksidanti v organizmu (Langseth, 2000). Na oksidacijski stres vplivajo različni dejavniki, kot so genetika, starost, prehrana, okolje, uživanje drog in zdravil (Valenzuela, 2002).

2.1.1 Prosti radikali in antioksidanti

Prosti radikali so zelo reaktivne in zato tudi nestabilne molekule z vsaj enim neparnim elektronom (Halliwell in Gutteridge, 2000). Igrajo pomembno vlogo v mnogih fizioloških in patoloških stanjih. Reagirajo praktično z vsako molekulo, s katero pridejo v stik, in tako v organizmu povzročijo celične poškodbe. V njihov nastanek v organizmu je pogosto vključen kisik, ki je, kljub temu, da je bistven za aerobne procese, v velikih koncentracijah lahko škodljiv (Ješe Janežič, 2001). Kisikovi prosti radikali predstavljajo najpomembnejši razred prostih radikalov, ki nastajajo v živih organizmih (Miller in sod., 1990). Glavni kisikovi prosti radikali so superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$), vodikov peroksid (H_2O_2) in peroksilni radikal ($ROO^{\cdot}$) (Korošec, 2000). Poleg kisikovih pa se v organizmu tvorijo tudi dušikovi prosti radikali, med katere spadata dušikov oksid ($NO^{\cdot}$) in dušikov dioksid ($NO_2^{\cdot}$). Nastanek prostih radikalov pa ni vedno negativen in slučajen proces, saj jih organizem proizvaja tudi namerno. Prosti radikali lahko pomagajo imunskemu sistemu pri zaščiti pred mikroorganizmi, pomembni so pri procesih celičnega signaliziranja in imajo ključno vlogo

pri reguliranju apoptoze (Seifried in sod., 2007). Težave nastopijo, ko pride do presežka prostih radikalov in se poruši ravnotežje med njimi in antioksidanti. Porušeno ravnotežje v korist prostih radikalov vodi do oksidacijskega stresa, kar prispeva k razvoju bolezni. Pri daljšem delovanju prostih radikalov se poveča tveganje za bolezni kot so rak, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, ateroskleroza, obolenja srca in ožilja, artritis, astma in diabetes (Valko in sod., 2007; Galaris in sod., 2008). Pri domačih živalih lahko pride do številnih bolezenskih stanj, ki vplivajo na prirejo in počutje živali (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Na obremenjenost organizma s prostimi radikali ima velik vpliv tudi prehrana, saj z njo v organizem vnašamo tako snovi, ki povečujejo oksidacijski stres (nenasičene maščobne kisline, toksine, alkohol ...), kot tudi snovi, ki oksidacijo preprečujejo, t.i. antioksidante (vitamini, polifenoli ...).

Antioksidanti so snovi, ki že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidacijske spremembe v bioloških sistemih, kamor štejemo tako žive organizme, kot tudi hrano (Salobir, 2000). Antioksidanti reagirajo s prostimi radikali, oddajo vodikov atom in povzročijo stabilizacijo radikalov. Takšni radikali zato težje vstopajo v verižne reakcije, zaradi česar se le-te ustavijo (Fellenberg in Speisky, 2006).

Poznamo več delitev antioksidantov. Ena je delitev glede na topnost, pri kateri ločimo topne v vodi oziroma hidrofilne in topne v maščobah, t.i. hidrofobne oziroma lipofilne antioksidante. Prvi reagirajo s prooksidanti v citoplazmi celic in v krvni plazmi, drugi pa ščitijo celične membrane pred lipidno peroksidacijo (Sies, 1997). Lahko jih razdelimo tudi na endogene in eksogene antioksidante (Frankič in Salobir, 2007). Endogene antioksidante organizem proizvede sam, medtem ko mora eksogene zaužiti s hrano oziroma krmo. Za regulacijo nivoja prostih radikalov pa so potrebni oboji (Salobir, 2000). Pri tej delitvi je meja težje določljiva, saj mora organizem za izgradnjo nekaterih endogenih antioksidantov zaužiti določene esencialne snovi (npr. selen). Med prehranske oziroma eksogene antioksidante štejemo različne vitamine (E, C, A), karotenoide, selen in druge elemente, potrebne za antioksidacijske encime, flavonoide, polifenole, prehranske in druge dodatke (CoQ₁₀, glutation, lipojska kislina ...) ter prehranske antioksidante (BHA, BHT, propil galat, terciarni butil hidroksi kinon, rožmarinov ekstrakt in drugi). Pri endogenih antioksidantih so najpomembnejše komponente glutation (GSH, prisoten tudi v živilih), Se-glutation peroksidaza, Fe-katalaza, NADPH, ubikvinol-10 (reducirani CoQ₁₀), sečna kislina, lipojska kislina, hormoni (melatonin, estrogen in drugi), beljakovine, ki vežejo kovine, vključno albumin (in nanj vezani tioli in bilirubin) in beljakovine, ki vežejo Fe in Cu (transferin in celuroplazmin) (Papass, 1999).

Naloga antioksidacijskih sistemov je varovanje živil na eni in organizma na drugi strani pred učinki prostih radikalov. Antioksidacijsko obrambo organizma lahko razdelimo na tri nivoje (Fang in sod., 2002; Surai, 2002a):

- **Primarna:** predstavljajo jo antioksidanti endogenega izvora, ki reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo oksidacije in poškodbe makromolekul. Sem prištevamo mitohondrijsko superoksid dismutazo (MnSOD), citoplazemsko superoksid dismutazo (Cu(Zn)SOD), Fe-katalazo, glutation peroksidazo (GPx) in glutation reduktazo (GR).
- **Sekundarna:** predstavljajo jo antioksidanti eksogenega in endogenega izvora, ki preprečujejo in zadržujejo vstop prostih radikalov v verižne reakcije, ne da bi se sami vključili vanje. Lovijo proste radikale in jih pretvarjajo v manj reaktivne spojine, pri čemer se oksidirajo in sami postanejo radikali, vendar zaradi energetske stabilnega neparnega elektrona niso reaktivni in jih drugi antioksidanti lahko reducirajo nazaj v osnovno obliko.
- **Terciarna:** predstavljajo jo snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice, in vračajo poškodovane molekule v prvotno stanje. Ta nivo antioksidacijske obrambe vključuje lipolitične (lipaze), proteolitične (peptidaze in proteaze) in druge encime (ligaze, nukleaze, polimeraze, proteaze, fosfolipaze in različne transferaze).

2.1.2 Oksidacijski stres pri domačih živalih

Oksidacijskemu stresu so pogosto izpostavljene tudi domače živali v intenzivni reji. Ta je lahko različnega izvora (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Povzročen je lahko s prekomernim vnosom snovi, ki oksidirajo, ali snovi, ki oksidacijski stres povzročajo.

V zadnjem času je najpogostejši prehranski oksidacijski stres, do katerega prihaja predvsem zaradi intenzivne reje živali in s tem večjih potreb po energiji, ki jih lahko pokrijemo z vključevanjem večjih količin maščob (rastlinska olja) v krmo. Poleg tega spremenjene navade ljudi oziroma novi prehranski trendi spodbujajo zauživanje nenasičenih maščob in povečevanje vključevanja večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) v prehrano živali za proizvodnjo t.i. funkcionalnih živil, bogatih z nenasičenimi maščobami. Ker pa se s tako prehrano ne poveča delež VNMK le v subkutani in intramuskularni maščobi živali, pač pa tudi v vseh ostalih tkivih, to poveča občutljivost celotnega organizma za oksidacijo, kar so dokazali pri kuncih (Tres in sod., 2009; Trebušak in sod., 2011), prašičih (Salobir in sod., 2005), perutnini (Cherian in Hayat, 2009; Gao in sod., 2010; Voljč in sod., 2011), govedu (Castillo in sod., 2005) in konjih (De Moffarts in sod., 2005).

Do oksidacijskega stresa pri domačih živalih lahko pride tudi zaradi okužene krme. V praktičnih pogojih reje je to pogost pojav, saj je krma lahko okužena s plesnimi, ki izločajo mikotoksine. Raziskave kažejo, da naj bi bilo z mikotoksini okuženega kar 25 % svetovnega pridelka žit (Fink-Gremmels, 1999). Kako le ti vplivajo na oksidacijski stres, še ni povsem znano. Lahko ga povzročajo neposredno s povečano tvorbo prostih radikalov ali pa je povečana dovzetnost tkiv za oksidacijo posledica slabšega delovanja antioksidacijskega sistema, saj naj bi mikotoksini zmanjšali absorpcijo antioksidantov skozi črevesno steno (Surai, 2002b). Raziskave so pokazale, da T-2 toksin poveča stopnjo poškodb DNA limfocitov pri piščancih (Frankič in sod., 2006) in prašičih (Frankič in sod., 2008). Omenili smo že, da pride do tvorbe prostih radikalov tudi ob delovanju imunskega sistema. Pomanjkanje antioksidantov poslabša delovanje imunskega sistema. Pri raznih vnetnih procesih se poveča delovanje imunskega sistema in s tem tvorba prostih radikalov. Ob tem so poškodbam podvržene tudi gostiteljeve celice in tkiva, zato se povečajo potrebe po antioksidantih. Antioksidanti, kot sta vitamin C in vitamin E, ščitijo makromolekule pred poškodbami s strani prostih radikalov (Calder in sod., 2009). Lahko pa pride do oksidacijskega stresa tudi zaradi okoljskih dejavnikov, predvsem zaradi previsokih temperatur v okolju. S tem se srečujemo predvsem pri reji perutnine in v predelih sveta z vročim podnebjem. Toplotni stres povzroča sproščanje kortikosterona in kateholaminov ter sproža lipidno peroksidacijo v celičnih membranah. Na splošno visoke temperature vodijo do manjšega zauživanja in slabšega izkoriščanja krme, počasnejše rasti in slabše prireje (Sahin in sod., 2003). Zato se pri toplotnem stresu potreba po antioksidantih poveča. Oksidacijski stres pa lahko povzročijo tudi različne bolezni, pri katerih terapije, ki temeljijo na povečanem zauživanju antioksidantov, lahko predstavljajo alternativo pri njihovem zdravljenju (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

2.2 NARAVNI DODATKI

Čeprav sintetične antioksidante pogosto uporabljajo v mesni industriji, se je zaradi večje ozaveščenosti porabnikov povečalo zanimanje za uporabo naravnih antioksidantov, kot so rastlinski izvlečki. Ti vsebujejo zelo različne molekule, ki vplivajo na presnovne in fiziološke funkcije živali (Greathead, 2003). Dodajanje rastlinskih izvlečkov kot antioksidantov v krmo pa poleg pomena za zdravje živali izboljša tudi oksidacijsko stabilnost živalskih proizvodov. Poleg tega jih lahko uporabljamo tudi v ekoloških rejah. Najbolj pogosti naravni antioksidanti so polifenoli (fenolne spojine), ki so zastopani v širokem spektru rastlin in imajo različne antioksidacijske lastnosti. Med seboj se razlikujejo po številu aromatskih obročev in stranskih verigah, ki so pripete na obroč. V rastlinah imajo več pomembnih funkcij, saj preprečujejo okužbe z mikroorganizmi, ščitijo rastline pred UV sevanjem in oksidacijskim stresom, odvrčajo rastlinojede živali, služijo kot signalne molekule in dajejo rastlini trdnost (Scalbert in sod., 2002). Aktivne komponente rastlinskih izvlečkov preprečujejo oksidacijo z lovljenjem prostih radikalov in s stimulacijo aktivnosti encimov (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation transferaza). Rastline (zelišča), bogate s fenoli in zato z velikim antioksidacijskim

potencialom, so rožmarin, timijan, žajbelj, origano, zeleni čaj, kamilica, ginko, regrat in ognjič (Dalle Zotte in Szendrő, 2011; Zhang in sod., 2010).

2.2.1 Svetlikava pološčenka (*Ganoderma lucidum*) ali reiši

Gobe so del človeške prehrane že tisočletja, njihova uporaba pa še vedno narašča. So dober vir kakovostnih beljakovin, vsebujejo veliko vlaknin in nenasičenih maščobnih kislin, bogate so z vitamini in rudninskimi snovmi, mnoge študije pa dokazujejo, da vsebujejo številne potencialne naravne antioksidante (Cheung in sod., 2003; Lindequist in sod., 2005; Cheung in Cheung, 2005; Kim in sod., 2008; Khatua in sod., 2013). Ti naravni antioksidanti lahko nevtralizirajo proste radikale in tako preprečujejo pojav žilnih in rakavih obolenj, oksidacijskega stresa in s tem poškodb DNA, beljakovin in membran. Poleg tega imajo gobe tudi protivnetne učinke oziroma stimulirajo imunski sistem (Guo in sod., 2004; Lindequist in sod., 2005; Johnson in sod., 2009;) in antibakterijske učinke (Hirasawa in sod., 1999; Hearst in sod., 2009). Poznane so po svojih zdravilnih učinkih kot so antitumorni, antibakterijski, antivirusni, hematološki in imunomodulatorni. Tako celične komponente kot tudi sekundarni metaboliti gob vplivajo na imunski sistem, zato jih lahko uporabljamo pri zdravljenju različnih bolezni (Ferreira in sod., 2007). Gobe so dober vir fenolov, flavonoidov, karotenov in askorbinske kisline, ki so znani antioksidanti (Froufe in sod., 2009). Poleg teh so pomembne antioksidacijske sestavine gob tudi tokoferoli in polisaharidi, med katerimi so najbolj aktivni β -glukani (Khatua in sod., 2013). Zaradi ugodnih učinkov jih že stoletja uporabljajo v tradicionalni medicini, predvsem na področju Azije. Gobe torej niso samo hrana, nekatere med njimi lahko uvrstimo v skupino zdravilnih gob z različnimi ugodnimi učinki. V to skupino lahko uvrstimo tudi gobo svetlikava pološčenka (slika 1).



Slika 1: Svetlikava pološčenka (*Ganoderma lucidum*) oziroma reiši (foto: Vida Rezar)

Figure 1: Ling Zhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) or Reishi (foto: Vida Rezar)

Svetlikava pološčenka (*Ganoderma lucidum*), na Japonskem imenovana reiši, je drevesna goba, ki raste tudi pri nas, predvsem na lesu listavcev (hrastovi in kostanjevi štori). Poznamo več vrst te gobe – rdečo, rumeno, škrlatno, črno, modro in belo (Chen in sod.,

1999), vendar je najbolj cenjena in uporabljana rdeča. Reiši sodi med užitne gobe, vendar se v prehrani redko uporablja zaradi trdne, lesnate strukture in zelo grenkega okusa. Prav okus pa v tradicionalni kitajski medicini presoja o učinkovitosti gobe – bolj ko je grenka, več zdravilnih učinkovin (triterpenov) vsebuje. Kitajci jo imenujejo Ling Zhi, kar v prevodu pomeni »goba nesmrtnosti«, in jo po uporabnosti uvrščajo na prvo mesto (Wachtel-Galor in sod., 2004a). Reiši je zelo bogata s hranili. Vsebuje predvsem veliko beljakovin z vsemi esencialnimi in neesencialnimi aminokislinami, malo enostavnih ogljikovih hidratov ter maščob in je bogata s polisaharidi z visoko molekulsko maso in antioksidanti. Vsebuje obilo vitaminov B₂, C, D, niacina in pantotenske kisline, ter rudninskih snovi, zlasti kalcija, fosforja in železa (Paterson, 2006).

Gobo reiši v tradicionalni vzhodni medicini uporabljajo že več kot 2000 let in ji pripisujejo mnoge zdravilne učinke. Ugodno vpliva na zdravljenje hipertenzije, alergij, vnetij, sladkorne bolezni in rakavih obolenj (Wachtel-Galor in sod., 2004a).

Večina gob vsebuje 90 % vode, ostalih 10 % pa pri gobi reiši sestavljajo surova vlaknina (59 %), ogljikovi hidrati (26–28 %), surove beljakovine (7–8 %) in surova maščoba (3–5 %) (Mau in sod., 2001). Poleg tega pa reiši vsebuje še množico bioaktivnih sestavin kot so terpenoidi, steroli, fenoli, glikoproteini in polisaharidi (Wachtel-Galor in sod., 2004a; Boh in sod., 2007; Zhou in sod., 2007). Najpomembnejše farmakološko aktivne spojine gobe reiši so triterpeni in polisaharidi (Paterson, 2006; Boh in sod., 2007).

Triterpeni so podvrsta terpenov in so v rastlinah pogosto prisotni. V gobi reiši so identificirali več kot 140 vrst triterpenov in triterpenoidov (Yue in sod., 2010; Wasser, 2005). Večina je grenkega okusa in se pojavljajo predvsem kot ganoderne kisline (Kim in Kim, 1999). Smina in sod. (2011a) navajajo, da imajo triterpeni iz gobe reiši antioksidacijske lastnosti *in vitro* in lahko zmanjšajo oksidacijske poškodbe z direktnim uničenjem prostih radikalov, nastalih v celicah. Poleg tega so triterpeni pri miših povečali dejavnost antioksidacijskih encimov in zmanjšali s sevanjem povzročene oksidacijske poškodbe DNA (Smina in sod., 2011b). Prav sposobnost lovljenja prostih radikalov in povečanje dejavnosti antioksidacijskih encimov kaže, kako zelo so triterpeni učinkoviti kot antioksidanti (Kao in sod., 2013).

Polisaharidi so polimerne strukture ogljikovih hidratov, povezane med sabo z glikozidno vezjo. V gobi reiši so identificirali številne vrste polisaharidov, večinoma v plodišču in podgobju, nekaj pa tudi v sporah (Sanodiya in sod., 2009). Novejše farmacevtske raziskave so pokazale, da imajo polisaharidi gobe reiši nekatere fiziološke in zdravilne učinke, kot so močna antioksidacijska (Xu in sod., 2009) in imunomodulatorna aktivnost (Lin in sod., 2006) ter so učinkoviti pri zdravljenju tumorjev (Paterson, 2006). Lu in sod. (2001) so ugotovili, da je dodatek polisaharidnih ekstraktov, pridobljen iz podgobja gobe reiši, v krmo podgan zmanjšal nastanek polipov v debelem črevesu verjetno zaradi zmanjšanja oksidacijskih poškodb, povzročenih z ROS (Lu in sod., 2001; Lu in sod., 2003). Poleg tega

amino-polisaharidi, imenovani »G009«, inaktivirajo hidroksilne radikale in superoksidne anione ter zmanjšujejo poškodbe DNA (Lee in sod., 2001).

2.2.2 Oljčni listi

Oljka (*Olea europaea*) je zimzelena rastlina in je tradicionalni simbol rodnosti, moči, obilja, slave in miru. Oljčne vejice so skozi zgodovino uporabljali za kronanje zmagovalcev, v prijateljskih igrah in vojnah. Njeni plodovi, olje in listi imajo bogato zgodovino v prehrani, zdravilni in obredni rabi (Soni in sod., 2006). Oljka je dobro odporna proti mikroorganizmom in insektom (Kubo in sod., 1995), njene liste pa uporabljajo kot zdravilo pri vročini in različnih boleznih, kot je malarija (Benavente-Garcia in sod., 2000). Danes je poznana predvsem po svojih plodovih in oljčnem olju.



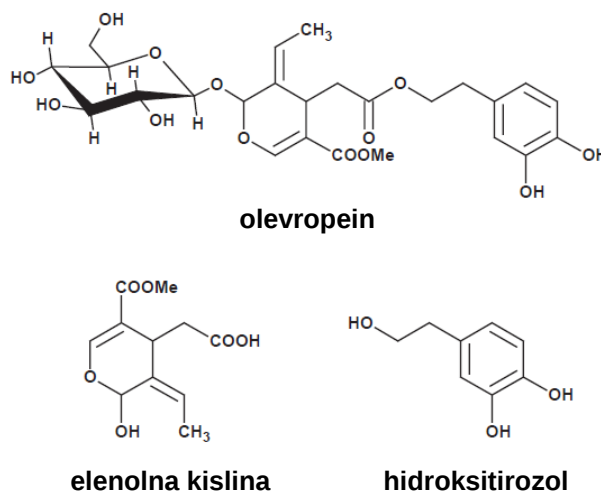
Slika 2: Oljka (*Olea europaea*) (foto: Vida Rezar)
Figure 2: Olive tree (*Olea europaea*) (foto: Vida Rezar)

Oljka (slika 2) je pomembna kultura Sredozemlja, saj se tu pridelava kar 98 % vse svetovne porabe oljk, kar predstavlja pomembne gospodarske in prehranske koristi za to regijo. Značilna je predvsem za evropske sredozemske otoke in države kot so Španija, Italija, Grčija, Francija, Izrael, Maroko, Tunizija in Turčija. Poleg sredozemskih regij pa jo pogosto gojijo tudi na Arabskem polotoku, v Indiji in Aziji.

Kot smo omenili, je oljka danes poznana predvsem po svojih plodovih, oljkah, in po olju, ki ga iz njih pridobivajo. Oljčno olje je pomemben del mediteranske prehrane, znano po svoji kakovosti in ugodnem delovanju proti najpogostejšim zdravstvenim tegobam. Številne epidemiološke raziskave so pokazale manjši pojav ateroskleroze, bolezni srca in ožilja in določenih vrst raka na področju Sredozemlja (Tripoli in sod., 2005). Deviško oljčno olje je pomembno prehransko olje, bogato z naravnimi antioksidanti, ki imajo izjemno farmakološko delovanje in nizko toksičnost. Prav zato je oljčno olje predmet mnogih znanstvenih raziskav, ki proučujejo njegove učinke. Z zmanjšanim tveganjem za razvoj bolezni srca in ožilja, rakavih obolenj in izboljšanim delovanjem imunskega sistema ga povezujejo predvsem zaradi visokega deleža bioaktivnih sestavin, kot so vitamini,

flavonoidi in polifenoli (Benavente-Garcia in sod., 2000; Visioli in sod., 2002). Še posebej pa je oljčno olje bogato s polifenolnimi antioksidanti.

Pri gojenju oljk in pri njihovi predelavi prihaja do velike količine stranskih proizvodov. Raziskave so pokazale, da z obrezovanjem enega drevesa oljke letno proizvedejo kar 25 kg odpada (vejice, listi), pri pridobivanju olja iz 100 kg oljk pa približno 35 kg trdega odpada (oljna pogača) in 100 litrov odpadne vode (Molina Alcaide in Nefzaoui, 1996). Poleg tega oljčni listi predstavljajo okrog 10 % skupne mase zbranega materiala za stiskanje olja (Paiva-Martins in sod., 2009). Ob takih količinah odpadnih produktov se je potrebno vprašati, kakšen je njihov vpliv na okolje in kako ga lahko zmanjšamo. V zadnjih letih je bilo veliko zanimanja na področju zdravilnih učinkov različnih čajev. Čaj iz oljčnih listov je eden najpogostejših tradicionalnih čajev, ki ga uporabljajo na področju Sredozemlja za zdravljenje nekaterih bolezni. Iz tega razloga se je med znanstveniki z različnih področij povečalo zanimanje za potencialne pozitivne učinke oljčnih listov. Ena od možnosti je uporaba oljčnih listov in tudi drugih stranskih proizvodov predelave oljk kot vira hranljivih snovi v prehrani domačih živali.



Slika 3: Struktura oleuropeina in njegovih derivatov (Al-Azzawie in Alhamdani, 2006)

Figure 3: Structure of oleuropein and its metabolites (Al-Azzawie and Alhamdani, 2006)

Oljke in oljčni listi so bogat vir fenolnih spojin, saj vsebujejo kar 1–3 % teh spojin. Glavne fenolne spojine oljčnih listov lahko razdelimo v 5 skupin in sicer oleuropeozidi, flavoni, flavonoli, flavan-3-oli in substituirani fenoli (Benavente-Garcia in sod., 2000; El in Karakaya, 2009). V raziskavah aktivnih sestavin oljčnih listov so odkrili, da imajo mnoge od njih pomembne biokemijske učinke. Največ pozornosti so namenili oleuropeinu in njegovim derivatom, elenolni kislini in hidroksitirozolu (slika 3). Oleuropein je glavni polifenol, ki sodeluje pri antioksidacijski zaščiti in je odgovoren za grenak in trpek priokus oljk, oljnega olja in listov. Prvič sta ga izolirala Bourquelot in Ventileco že leta 1908.

Fenolne spojine so rastlinski sekundarni metaboliti, ki imajo pomembno vlogo pri odpornosti proti boleznim (Servili in Montedoro, 2002; Antolovich in sod., 2000) in zaščiti pred škodljivci. Zanimanje za te spojine je povezano z njihovim antioksidacijskim delovanjem in ugodnim učinkom na zdravje (Ryan in sod., 2002). Fenolne spojine so pomembna skupina naravno prisotnih spojin v rastlinah in so pogoste v mediteranski prehrani, ki vključuje veliko namiznih oljk in oljčnega olja (Manna in sod., 1999; Servili in sod., 2004; De la Torre-Carbot in sod., 2005). Raziskave, opravljene na izvlečkih oljčnih listov, so pokazale njihovo učinkovitost pri zniževanju visokega krvnega pritiska in sladkorja ter protimikrobno in antioksidacijsko delovanje (Benavente-Garcia in sod., 2000). Altarejos in sod. (2005) so antioksidacijsko delovanje dokazali tudi pri ekstraktih oljčnega lesa. Poleg tega se je pokazalo, da olevropein (sekoiridoidni derivat) ugodno vpliva na znižanje holesterola in krvnega sladkorja (Romani in sod., 1999) ter je močan antioksidant s protivnetnimi lastnostmi (Benavente-Garcia in sod., 2000). Hidroksitirozol, produkt razgradnje olevropeina, ima prav tako nekatere pomembne biološke lastnosti in tako preprečuje nastanek nekaterih bolezni, kot so bolezni srca in ateroskleroza, kar je vzbudilo zanimanje za proučevanje teh fenolnih spojin (Cardoso in sod., 2005). Olevropein in hidroksitirozol sta naravno prisotni fenolni spojini v oljkah. Olevropein je v visokih količinah prisoten v nepredelanih oljkah, medtem ko je obilo hidroksitirozola v predelanih oljkah in oljčnem olju (Tan in sod., 2003). Olevropein je odgovoren za grenak okus nezrelih in nepredelanih oljk in predstavlja 14 % suhe mase nezrelih oljk. Tekom zorenja, skozi procese hidrolize pa dobimo nekaj preprostih molekul, kot so hidroksitirozol in olevropein aglikon (Tan in sod., 2003).

Olevropein povezujejo tudi z mnogimi za zdravje koristnimi lastnostmi, ki so večinoma povezane z njegovim antioksidacijskim delovanjem. Al-Azzawie in Alhamdani (2006) sta raziskovala, kako dodatek olevropeina znižuje oksidacijski stres in hiperglikemijo (povišano raven sladkorja v krvi) pri kuncih. Rezultati so pokazali, da so se z dodatkom 20 mg olevropeina na kg telesne mase, vrednosti malondialdehida (MDA) in krvnega sladkorja znižale na raven kontrolne, zdrave skupine. O antioksidacijskih lastnostih oljčnih listov so poročali tudi Botsoglou in sod. (2010), ki so z njihovim dodatkom izboljšali oksidacijsko stabilnost mesa in ugotovili ugoden vpliv tudi na antibakterijsko zaščito.

2.3 MESO KOT FUNKCIONALNO ŽIVILO

Meso in mesni proizvodi imajo pomembno vlogo v prehrani ljudi, saj so pomemben vir kakovostnih beljakovin, maščob, esencialnih aminokislin, rudninskih snovi, vitaminov in drugih hranljivih snovi (Zhang in sod., 2010), ki jih v prehrani ljudi sicer pogosto primanjkuje. Meso je od nekdaj veljalo za živilo, ki je optimalno za zdravo rast in razvoj človeka, vendar se je v zadnjem času ta ugled zmanjšal zaradi mnenja, da vsebuje veliko maščob neugodne sestave. Kot vemo pa so maščobe pomemben sestavni del živil in so v človeški prehrani nujno potrebne zaradi svojih ugodnih učinkov. Vplivajo na prehransko, energijsko in senzorično vrednost hrane. Izboljšujejo okus in aromo živil ter so vir večkrat

nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), med katerimi so pomembne predvsem n-3 VNMK in v maščobah topnih vitaminov (A, D, E, K) (Marcinčák in sod., 2005).

Omenili smo, da do oksidacijskega stresa pri domačih živalih prihaja predvsem zaradi vključevanja večjih količin maščobe v njihovo krmo. Prebivalstvo v razvitem svetu s prehrano zaužije premalo esencialnih hranil, med katere spadajo tudi VNMK, predvsem n-3 VNMK. Pomanjkanje teh maščobnih kislin povečuje tveganje za razvoj različnih bolezni, predvsem srčno žilnih obolenj. Zaradi sodobnih prehranskih trendov se je povečalo zanimanje za pridobivanje živalskih proizvodov z višjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin. Na maščobnokislinsko sestavo mesa in tudi ostalih živalskih proizvodov (jajca, mleko), ki so namenjeni za prehrano ljudi, lahko najbolj vplivamo s krmo, ki jo krmimo živalim (Leskanick in Noble, 1997; Raes in sod., 2004; Wood in sod., 2003). Ker pa so zato živali in tudi njihovi proizvodi bolj izpostavljeni oksidaciji in so slednji manj stabilni (Lauridsen in sod., 1997; Guo in sod., 2001; Govaris in sod., 2004; Cortinas in sod., 2005; Zhang in sod., 2009; Dal Bosco in sod., 2004; Bianchi in sod., 2006), moramo zagotoviti v živalski prehrani tudi dovolj antioksidantov. Pri avtooksidacijskih procesih v živilih in tudi v krmi nastajajo zelo komplekse zmesi hidroperoksidov, produktov cepljenja verig, oksidiranih sterolov in polimernih snovi, ki so pri oralnem ali parenteralnem vnosu škodljive za zdravje (Skvarča, 2000; Chow, 2000). Lipidna oksidacija je eden glavnih vzrokov za slabšanje kakovosti mesa in mesnih izdelkov med skladiščenjem, kar se kaže v spremembi barve, okusa, teksture in prehranske vrednosti mesa (Jensen in sod., 1997).

2.3.1 Maščobne kisline in maščobnokislinska sestava mesa

Maščobe so skupine snovi v rastlinskih in živalskih tkivih, ki niso topne v vodi in so topne v običajnih organskih topilih (benzen, eter, kloroform). V prehrani uporabljamo maščobe rastlinskega in živalskega izvora, njihova glavna komponenta pa so trigliceridi, estri glicerola z maščobnimi kislinami. Maščobe v organizmu predstavljajo vir energije, izolacijsko plast, vsebujejo v maščobah topne vitamine (A, D, E in K) in pospešujejo njihovo absorpcijo, so sestavni deli celičnih membran ter vsebujejo življenjsko pomembne maščobne kisline (Harfoot in Hazlewood, 1997). Maščobne kisline razdelimo na nasičene (NMK), enkrat nenasičene (ENMK) in VNMK. Esencialne maščobne kisline so tiste, ki jih naš organizem ne more sam sintetizirati in jih moramo zaužiti. Linolna (n-6) in α -linolenska kislina (n-3) sta esencialni maščobni kislini, iz katerih nastajajo dolgoverižne VNMK. Iz linolne nastane arahidonska kislina, iz linolenske pa eikozapentaenojska (EPA) in dokozaheksaenojska kislina (DHA). Številne epidemiološke in klinične študije so pokazale, da ima dodatek n-3 VNMK v prehrani ljudi ugoden učinek na zdravje. To še posebej velja za EPA in DHA (Connor, 2000). V prehrani ljudi pogosto manjka n-3 VNMK in zaradi večjega vnosa n-6 VNMK pride do preširokega razmerja med njimi, celo do 15 : 1 (Simopoulos, 2002), medtem ko je ugodno razmerje po priporočilih WHO (2003) med 5 : 1 in 8 : 1. Te spremembe v prehrani so eden glavnih razlogov za razvoj civilizacijskih bolezni in umiranja zaradi njih.

Maščobnokislinska sestava mesa je odvisna od živalske vrste, pasme, prehrane, spola, starosti, fizične aktivnosti in drugih fizioloških faktorjev (Fennema, 1997). V proizvodih, kot so meso, jajca in mleko, je maščobnokislinska sestava rezultat tako biosinteze maščobnih kislin v tkivih kot tudi maščobnokislinske sestave zaužitih maščob (Mouroto in Hermier, 2001). Ta povezava je močnejša pri neprežvekovalcih (prašiči, perutnina, kunci), saj pri prežvekovalcih prihaja do hidrogenacije maščobnih kislin v vampu (Kouba in Mouroto, 2011). Maščobnokislinsko sestavo mesa pri neprežvekovalcih najlažje spreminjamo s prehrano, saj ima maščobnokislinska sestava maščob krme velik vpliv na sestavo mesa. Zaradi visoke vsebnosti α -linolenske kisline (C 18:3 n-3) je laneno olje in seveda tudi laneno seme (preglednica 1) primeren in pogosto uporabljen rastlinski vir n-3 VNMK.

Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin z 18 ogljikovimi atomi v nekaterih prehransko pomembnih rastlinskih oljih in lanenem semenu (g/100 g) (Souci in sod., 2008)

Table 1: Content of fatty acid with 18 carbon atoms in of some nutritionally important vegetable oils and linseed (g/100g) (Souci *et al.*, 2008)

	C18:1 n-9	C18:2 n-6	C18:3 n-3
Sončnično olje	19,9	63,1	0,5
Koruzno olje	25,5	55,5	0,9
Sojino olje	18,6	52,9	7,7
Oljčno olje	69,4	8,3	0,8
Repično olje	52,2	22,4	9,6
Kokosovo olje	6,6	1,6	-
Palmovo olje	36,3	9,6	0,5
Laneno olje	19,1	14,3	52,8
Laneno seme	5,6	4,2	16,7

Tako lahko z dodajanjem rastlinskih olj s primerno maščobnokislinsko sestavo v krmo živali povečamo delež VNMK v mesu (Wood in sod., 2003). Zauživanje takega mesa zmanjša možnost za razvoj obolenj srca in ožilja pri ljudeh, saj zoži razmerje med n-6 in n-3 maščobnimi kislinami, kar ugodno vpliva na zdravje ljudi. V zdravi prehrani ljudi zato priporočamo predvsem uživanje tistih vrst mesa, ki vsebujejo manj nasičenih maščobnih kislin in holesterola ter več VNMK, kamor sodi tudi kunčje meso.

Kunčje meso sodi med puste vrste mesa in je izredne kakovosti. Je belo, po videzu in sestavi zelo podobno piščančjemu mesu. Prehrambeni strokovnjaki ga pogosto priporočajo pri dietni prehrani in pri boleznih srca in ožilja (Dalle Zotte, 2002). Kunčje meso je lahko prebavljivo in značilnega blagega okusa, vsebuje veliko beljakovin in malo maščob. Priporočajo ga starejšim ljudem, nosečnicam, otrokom in športnikom. Zaradi nizke vsebnosti maščob in holesterola pa je primerno tudi za ljudi, ki so nagnjeni k aterosklerozi.

Sestava mesa je odvisna od več dejavnikov, kot so vrsta živali, spol, starost, genotip, pasma, prehrana in sam način obdelave oziroma predelave mesa. Zaradi omenjenih številnih vplivov prihaja do odstopanj med podatki različnih avtorjev. Podobno kot meso ostalih domačih živali, kunčje meso vsebuje okrog 70 % vode in približno 20 % beljakovin (preglednica 2). Ima pa kunčje meso nižjo vsebnost maščob in nižjo energijsko vrednost v primerjavi s svinjino in govedino.

Preglednica 2: Kemijska sestava (%) in energijska vrednost mesa (kJ) (Dalle Zotte, 2002)
Table 2: Chemical composition (%) and energy value of meat (kJ) (Dalle Zotte, 2002)

	Svinjina	Govedina	Piščanje meso	Kunčje meso
Voda (%)	70,5	69,1	72,2	70,8
Beljakovine (%)	18,5	19,5	20,1	21,3
Maščobe (%)	8,7	9,0	6,6	6,8
Energija (kJ)	639	665	586	618

Seveda pa se različne vrste mesa razlikujejo tudi v maščobnokislinski sestavi, ki je prav tako odvisna od številnih dejavnikov (Fennema, 1997). Maščobnokislinska sestava mesa različnih živalskih vrst je prikazana v preglednici 3.

Vidimo lahko, da imata piščanje bedro in kunčje meso relativno visoko vsebnost VNМК in sta zato primerna za dietno prehrano. Med maščobnimi kislinami je precej esencialnih maščobnih kislin, ki znižujejo raven holesterola v krvi, delež nasičenih maščobnih kislin pa je manjši kot pri drugih vrstah mesa. Kunčje meso vsebuje največji delež α -linolenske kisline (C 18:3 n-3) in ima zato nizko razmerje med linolno (C 18:2 n-6) in α -linolensko kislino, ki sta esencialni maščobni kislini in jih moramo vnesti v telo s hrano. Simopoulos (2002) navaja kot optimalno razmerje med n-6 in n-3 VNМК celo 4 : 1 ali manj. Najmanj VNМК vsebuje goveje meso, vendar ima zaradi fiziologije prebave in zauživanja rastlinske krme ugodno razmerje med n-6 in n-3 VNМК. Maščobnokislinska sestava kunčjega mesa je boljša v primerjavi z ostalimi vrstami mesa, ker kunčja krma običajno vsebuje veliko lucerne z visokim deležem n-3 VNМК.

Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava in vsebnost holesterola v mesu (mg/100 g) (Golob in sod., 2006)

Table 3: Fatty acid composition and cholesterol content of meat (mg/100 g) (Golob *et al.*, 2006)

	Svinjina		Govedina		Piščančje meso		Kunčje meso
	ledja	stegno	ledja	stegno	prsa	bedro	trup
NMK	1357	1361	839	639	289	1020	1331
ENMK	1487	1559	755	667	317	1374	1077
C 18:2 n-6	341	394	77	105	235	974	919
C 18:3 n-3	18,5	21,7	18,6	19,4	15,7	71,3	164
VNMK	416	489	149	193	294	3245	1177
n-6	386	449	105	144	268	1053	979
n-3	27,1	36,3	37,1	43,1	21,1	96,8	177
n-6/n-3	13,7	12,4	2,8	3,3	12,7	10,9	5,5
Holesterol	74,8	77,7	72,7	73,7	60,2	69,7	64,2

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

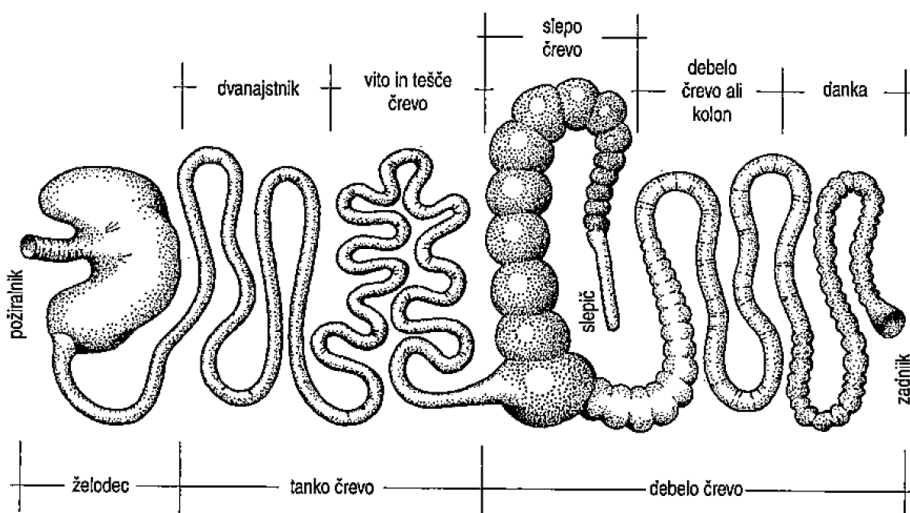
Če povzamemo, kunčje meso ne vsebuje veliko maščob, poleg tega pa ima ugodno maščobnokislinsko sestavo, saj vsebuje okrog 60 % nenasičenih maščobnih kislin in več kot 30 % VNMK. S prehranskega stališča je zanimivo tudi zaradi nizke vsebnosti holesterola. Poleg tega vsebuje veliko vezivnega tkiva, zato ima tudi znatno večje količine esencialnih aminokislin kot druge vrste mesa. Vsebuje veliko vitaminov skupine B, predvsem B₁₂, in dosti rudnin, izstopa vsebnost kalcija, bakra in železa. Posebno zanimiva pa je majhna vsebnost purinskih snovi in holesterina (Grün, 2002).

Zaradi specifične fiziologije prebave pri kuncih smo pri spremembah prehrane močno omejeni, saj z njimi lahko povzročimo večji pogin živali (Kermauner in Žgur, 2003). Pomembna je predvsem pravilna izbira krmne mešanice, razmerje med beljakovinskimi in energijskimi komponentami krme, nikakor pa ne smemo pozabiti na vlaknino in aminokisline (metionin, lizin, treonin). Maščobe so izjema, saj njihov dodatek nima negativnega vpliva na zdravje živali, lahko pa precej vpliva na prirejo in klavne lastnosti (Maertens, 1998). Kunci lahko dobro prebavijo čiste masti, olja ali krmila, bogata z maščobami, zato lahko rastlinska olja v prehrani kuncev uporabimo za izboljšanje maščobnokislinske sestave kunčjega mesa (Dalle Zotte, 2002). Pri dodatku 2–6 % maščob v krmo izboljšamo rast kuncev in izkoriščanje posameznih hranljivih snovi. To povzroči hitrejšo rast in nižje vsebnosti medmišične maščobe, pozitivno pa vpliva tudi na maso trupa in kakovost mesa. Večji dodatek maščob, nad 9 %, pa povzroči slabše izkoriščanje krme, poveča se nalaganje maščob in zmanjša klavni izkoristek (Xiccato, 1999). Poleg tega obstaja nevarnost, da bi prišle maščobe neprebavljene skozi tanko črevo in bi v slepem

črevesu porušile mikrobno ravnovesje (Grün, 2002). V praktičnih pogojih krmljenja kuncev je večje vključevanje rastlinskih olj (več kot 3 %) onemogočeno zaradi zmanjševanja trdote peletov, zato se za vnos n-3 VNMK uporablja predvsem laneno seme.

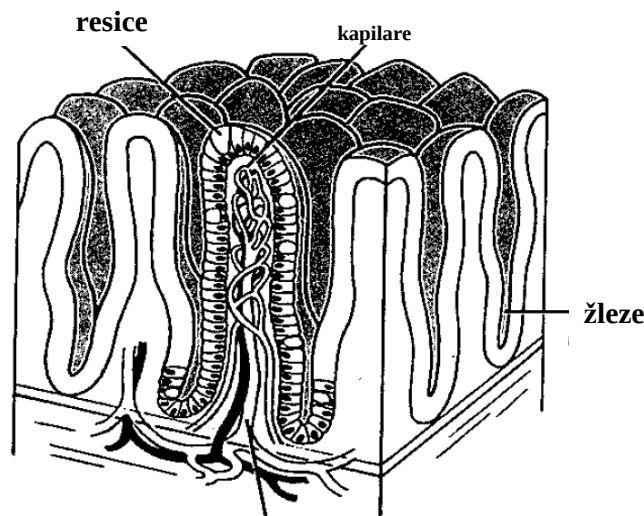
2.4 PREBAVNI SISTEM PRI KUNCIH

Prebavila pri kuncih (slika 4) se kot pri ostalih živalskih vrstah začnejo z usti oziroma ustno votlino. Tu se krma premeša s slino in začne se razgradnja škroba. Krma nato po požiralniku pride v želodec, kjer se izloča želodčni sok, ki vsebuje solno kislino in encime za razgradnjo beljakovin. Zaradi nizkega pH (1,5 do 2,5) se ustavi razgradnja škroba, začne pa prebava beljakovin.



Slika 4: Prebavni organi kunca (Grün, 2002)
Figure 4: The digestive tract of rabbit (Grün, 2002)

Krma nato potuje naprej proti tankemu črevesu pod pritiskom na novo zaužite krme, ker je želodec slabo omišičen in so krčenja slabotna. Zato je pri kuncih pomembno pogosto zauživanje majhnih obrokov. V prvem delu tankega črevesa, dvanajstniku, žolč raztopi maščobe v drobne kroglice, ki jih nato encimi iz trebušne slinavke in črevesnega soka lahko razgradijo. Encimi nadaljujejo tudi prebavo beljakovin in razgradnjo nekaterih ogljikovih hidratov (škrob in sladkorji). Vlakovina oziroma neškrobni polisaharidi ostanejo neprebavljeni skozi celotno tanko črevo. Beljakovine se razgradijo do aminokislin, maščobe do maščobnih kislin in glicerola, škrob in sladkorji pa do glukoze do konca tankega črevesa, ki ga sestavljata še vito in tešče črevo. Tu poteka tudi absorpcija razgradnih produktov skozi črevesno sluznico v kri in limfo (Grün, 2002). Glavna fiziološka funkcija tankega črevesa je prebava krme in absorpcija hranljivih snovi, elektrolitov ter vode, ima pa tudi pomembno sekretorno, metabolno, endokrino (tvorba hormonov), živčno (tvorba nevrottransmiterjev) in imunsko (obramba pred bakterijami, endotoksini in antigeni) funkcijo.



Slika 5: Prečni prerez črevesne stene (Sklan, 2004)

Figure 5: Cross section of gut wall (Sklan, 2004)

Stena v tankem črevesu tvori črevesne resice (*villi intestinales*), ki segajo v lumen črevesa (slika 5). Resice so najdaljše v dvanajstniku, v vitem in teščem črevesu pa se razredčijo in tudi skrajšajo. Črevesne resice povečajo površino tankega črevesa, kar izboljša absorpcijo hranljivih snovi. Med črevesnimi resicami in pod njimi se nahajajo Lieberkühnovе kriptе (*glandulae intestinales*) oziroma intestinalne žleze, ki izločajo črevesni sok z encimi, vsebujejo pa tudi izvorne celice, kjer nastajajo vedno nove črevesne celice (enterociti) (Ross in sod., 1995). Črevesna sluznica se tako nenehno obnavlja, višina črevesnih resic pa je odvisna od hitrosti delitve enterocitov v žlezah. Hitrost nadomeščanja novih celic je ključnega pomena pri hitrosti vzpostavljanja nove strukture črevesa in učinkovitosti prebave. Prepočasna obnova črevesa je razlog za atrofijo resic, za slabšo prebavo in absorpcijo hranil, kar prizadene rast in zdravstveno stanje živali. Ker tanko črevo, ki pri kuncih v povprečju meri tri metre, predstavlja obsežno mesto prebave in absorpcije hranil, lahko z njegovim funkcionalnim in morfološkim razvojem deloma pojasnimo zmogljivost prebave. Pri mladih kuncih je morfološki razvoj črevesja še vedno slabo raziskan in dokumentiran. Odstavitev močno prizadene prebavila, predvsem morfološko zgradbo in funkcijo tankega črevesa; črevesne resice se skrajšajo (atrofirajo), zaradi česar se zmanjša absorpcijska površina črevesa, kar je glavni razlog za slabo izkoriščanje krme in motnje v prebavi (Yu in Chiou, 1997). Sluznica tankega črevesa je pred odstavitvijo zelo nagubana in oblikuje resice v obliki iztegnjenih prstov. Po odstavitvi pa se resice skrajšajo in se iz oblike iztegnjenih prstov spremenijo v obliko longitudinalno sploščenih listov ali jezikov (Gallois in sod., 2005).

Do konca tankega črevesa je prebava pri kuncih enaka prebavi pri ostalih neprežvekovalcih, razlike se pojavijo v zadnjem delu prebavil. Neprebavljena krma potuje naprej v debelo črevo, sestavljeno iz slepega črevesa, kolona in danke. V prvem delu

debelega črevesa poseben mehanizem ločevanja delcev omogoča, da se slepo črevo, ki obsega kar 40 % celotne prostornine prebavil, napolni z delci neprebavljene krme, ki je odličen vir hranljivih snovi za mikroorganizme. Slepo črevo ima pri kuncih podobno vlogo kot vamp pri prežvekovalcih. Naseljuje ga veliko število mikroorganizmov, ki razkrajajo neprebavljene delce krme, predvsem neškrobne polisaharide (celulozo, hemiceluloze, ksilane in pektine) do hlapnih maščobnih kislin, ki se absorbirajo skozi sluznico za pokrivanje energijskih potreb. Velike delce, ki jih slepo črevo ne more razgraditi, mehanizem ločevanja potiska naprej v debelo črevo proti danki in zadnjiku, kjer se izločijo kot odpadke oziroma blato. Kunci poleg trdega blata v posebnem procesu cekotrofije izločajo tudi mehko blato ali cekotrofe. Ti se v cikličnem dnevnem ritmu oblikujejo iz vsebine v slepem črevesu, v kolonu dobijo sluzast ovoj in se izločijo po isti poti kot trdo blato, kjer jih kunec takoj požre. Na ta način produkti mikrobne prebave ponovno pridejo na začetek prebavnega trakta. Prebavni sistem kuncev torej hitro izloča tiste hranljive snovi, ki jih ne more izkoristiti (velike celulozne delce), učinkovito izkoristi majhne delce, zaradi cekotrofije pa kunci dobijo še dodatne beljakovine (mikroorganizmi) in vitamine, ki jih vsebujejo cekotrofi (Grün, 2002).

Prebavne težave so pri kuncih glavni vzrok za smrtnost in bolehnost. Prebavni sistem ima poleg prebavne funkcije tudi funkcijo obrambe pred nezaželenimi mikroorganizmi. Ti dve funkciji se pod vplivom ontogenetskih faktorjev, prehrane in medsebojnega delovanja med mikroorganizmi postopoma razvijata od rojstva pa do 8–10 tedna starosti (Fortun-Lamothe in Gidenne, 2006). Zato je predvsem pomembno obdobje v času odstavitve, ko je prebavni trakt kuncev podvržen številnim spremembam. V tem obdobju se prebavni trakt še razvija, hkrati pa se mora prilagoditi na novo vrsto krme, pride do sprememb v izločanju in aktivnosti encimov, ki prebavljajo nov tip hranljivih snovi, oblikovati pa se mora tudi nova bakterijska mikroflora. V času odstavitve pride do pomembnega anatomskega razvoja končnih delov prebavil, povezanih z razvojem mikrobne fermentacije in cekotrofije in razvoja prebavnih funkcij črevesa, zaradi zmanjšanja (laktaza) ali povečanja (amilaza, tripsin) aktivnosti črevesnih encimov (Gallois in sod., 2005). Spremembe so v veliki meri posledica ontogenetskega razvoja, vendar nanje lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. prehrana. Prav razumevanje vpliva prehrane na razvoj prebavil je bistvenega pomena za preprečevanje prebavnih bolezni.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PREHRANSKI POSKUS

3.1.1 Krma

V poskus smo vključili štiri skupine živali. Prva skupina, negativna kontrola (KONT -) je prejela krmo z dodano palmovo mastjo (Juchem GmbH, Nemčija), ki je bogata z nasičenimi maščobnimi kislinami (NMK), pri ostalih treh skupinah pa smo sprožili oksidacijski stres z dodatkom lanenega olja (Gustav Heess, Nemčija) z visoko vsebnostjo n-3 VNMK (preglednica 4). Druga skupina (KONT +) je predstavljala pozitivno kontrolo in naj bi pokazala, kaj se zgodi pri oksidacijskem stresu. Ostali dve skupini pa sta prejeli še naravne dodatke; gobo svetlikava pološčenka oziroma reiši v obliki pripravka Galimmun[®] (Zavod za naravoslovje, Ljubljana, Slovenija) (GOBE) ali posušene, zmlete oljčne liste (OLJKE), s katerima smo poskušali zmanjšati povzročen oksidacijski stres.

Štiri poskusne skupine smo krmili po naslednjem sistemu:

- skupina KONT - negativna kontrola → palmova mast (6 %)
- skupina KONT + pozitivna kontrola → laneno olje (6 %)
- skupina GOBE dodatek gob → laneno olje (6 %) + Galimmun[®] (1 %)
- skupina OLJKE dodatek oljčnih listov → laneno olje (6 %) + oljčni listi (1 %)

Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava in vsebnost tokoferolov v palmovi masti in lanenem olju

Table 4: Fatty acid composition and concentration of tocopherols in palm fat and linseed oil

	Palmova mast	Laneno olje
Maščobnokislinska sestava (masni delež, %)		
C16:0	42,96	5,55
C18:0	54,35	4,53
C18:1 n-9	0,42	17,78
C18:2 n-6	0,02	15,52
C18:3 n-3	< 0,01	55,55
Σ NMK	99,55	10,69
Σ ENMK	0,42	18,12
Σ VNMK	0,04	71,19
Σ n-3 VNMK	< 0,01	55,60
Σ n-6 VNMK	0,03	15,59
n-6/n-3 VNMK	7,92	0,28
Vitamin E (mg/kg)		
α-tokoferol	122	6,3
γ-tokoferol	152	496

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

3.1.1.1 Sestava uporabljenih krmnih dodatkov

Dodatki, ki smo jih uporabljali v našem poskusu, so naslednji:

- svetlikava pološčenska Galimmun[®] pripravek
- oljčni listi posušeni, zmleti oljčni listi

Pripravek Galimmun[®] (Zavod za naravoslovje, Ljubljana, Slovenija) je prehransko dopolnilo iz gobe svetlikava pološčenska. Sestavljen je iz zmletih trosnjakov in podgobja gob iz ekološke pridelave. Ker vsebuje tako gobo kot tudi podgobje in njegove ekstracelularne komponente, vsebuje najširši spekter aktivnih sestavin svetlikave pološčenske. Poleg tega vsebuje velik delež najrazličnejših vlaknin.

Oljčne liste smo sveže pridobili v Oljarni Babič (Marezige, Slovenija). Liste smo posušili, zmleli in shranili v hladnem, temnem in suhem prostoru.

In vitro antioksidacijski potencial, koncentracijo vitamina E in kemijsko sestavo pripravka Galimmun[®] in posušenih oljčnih listov smo določili v Kemijskem laboratoriju Katedre za prehrano na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete (preglednica 5).

Preglednica 5: *In vitro* antioksidacijski potencial, koncentracija vitamina E in kemijska sestava uporabljenih krmnih dodatkov

Table 5: *In vitro* antioxidant potential, vitamin E concentration and chemical composition of used supplements

	Galimmun [®]	Oljčni listi
ACW (mmol ekv. askorbinske kisline/kg)	5,4	1254
ACL (μmol ekv. trolox/kg)	61,4	2877
Vitamin E (mg/kg)		
α-tokoferol	/	195,1
γ-tokoferol	2,1	2,8
Kemijska sestava		
suha snov (SS) (g/kg)	979,1	938,8
surove beljakovine (g/kg SS)	182,9	119,3
surove maščobe (g/kg SS)	12,4	30,7
surova vlaknina (g/kg SS)	201,4	240,1
surovi pepel (g/kg SS)	43,5	74,0
BDI (g/kg SS)	559,9	536,0

ACW – antioksidacijska kapaciteta v vodi topnih spojin; ACL – antioksidacijska kapaciteta v maščobah topnih spojin; BDI – drezdušični izvleček

3.1.1.2 Sestava poskusnih krmnih mešanic

Krmne mešanice vseh poskusnih skupin so bile v osnovi sestavljene iz lucerne, ječmena, sončničnih tropin, senene moke, repičnega olja in premiksa (preglednici 6 in 7). Negativno kontrolo je predstavljala skupina KONT -, ki se je od ostalih razlikovala v tem, da je namesto dodatka lanenega olja vsebovala palmovo mast, bogato z NMK. Sestava poskusnih krmnih mešanic je prikazana v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava poskusnih krmnih mešanic (g/kg krmne mešanice)
Table 6: Composition of experimental feed mixtures (g/kg feed mixture)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE
Lucerna	458,3	458,3	448,3	448,3
Ječmen	130,0	130,0	130,0	130,0
Sončnične tropine	210,0	210,0	210,0	210,0
Senena moka	100,0	100,0	100,0	100,0
Repično olje	10,0	10,0	10,0	10,0
Palmova mast	60,0			
Laneno olje		60,0	60,0	60,0
Galimmun [®]			10,0	
Oljčni listi				10,0
Metionin	0,5	0,5	0,5	0,5
Lizin	2,0	2,0	2,0	2,0
Premiks	5,0	5,0	5,0	5,0
Lignobond*	20,0	20,0	20,0	20,0
Sol	4,2	4,2	4,2	4,2

* vezalec za peletiranje

Imena skupin so razložena na strani 20

Pripravili smo tri osnovne krmne mešanice. Skupno mešanico za obe kontrolni skupini in mešanici z gobami oziroma oljčnimi listi. Pripravljene krme mešanice smo peletirali v podjetju Jata Emona, Novo Mesto. Peletiranje je brez dodane palmove masti in lanenega olja potekalo pri 65 °C. Končne poskusne krmne mešanice z dodanimi maščobami (palmova mast, laneno olje) smo pripravljali dnevno tako, da smo laneno olje popršili po peletih, palmovo mast pa smo s kratkim segrevanjem prav tako nanесли na površino peletov.

Preglednica 7: Sestava premiksa (g/kg)

Table 7: Premix composition (g/kg)

	Vsebnost na kg premiksa
Rudninske snovi	
železo (Fe)	31,25
baker (Cu)	6,40
cink (Zn)	25,00
mangan (Mn)	32,26
kobalt (Co)	20,00
jod (I)	0,59
selen (Se)	3,00
Vitamini	
vitamin A	2,00
vitamin D ₃	0,40
vitamin E	12,00
vitamin K ₃	0,80
vitamin B ₁ , tiamin	0,40
vitamin B ₂ , riboflavin	1,50
vitamin B ₃ , niacin	10,00
vitamin B ₅ , pantotenska kislina	4,00
vitamin B ₆ , piridoksin	0,40
vitamin B ₁₂ , cianokobalamin	2,00
vitamin B ₉ , folna kislina	1,00
vitamin B ₈ , biotin	1,00
vitamin B ₇ , holin	66,66
Pšenični otrobi	779,34

Kemijska sestava, vsebnost izomer vitamina E (α - in γ -tokoferol) in maščobnokislinska sestava poskusnih krmnih mešanic so prikazane v preglednici 8.

Preglednica 8: Kemijska analiza poskusnih krmnih mešanic
Table 8: Chemical analysis of experimental feed mixtures

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE
Kemijska sestava				
suha snov (SS) (g/kg)	932,89	912,37	924,34	921,70
surove beljakovine (g/kg SS)	191,22	195,64	196,04	192,50
surove maščobe (g/kg SS)	115,88	94,64	92,01	93,39
surova vlaknina (g/kg SS)	243,79	250,13	246,83	246,33
BDI (g/kg SS)	374,96	383,22	387,82	391,99
surovi pepel (g/kg SS)	74,15	76,37	77,30	75,78
Vitamin E (mg/kg)				
α -tokoferol	24,27	21,35	21,71	29,75
γ -tokoferol	28,69	27,96	27,82	31,46
Maščobnokislinska sestava (g/100 g maščobnih kislin)				
C12:0	0,20	0,04	0,04	0,04
C14:0	0,89	0,12	0,12	0,12
C16:0	35,81	8,00	8,06	8,07
C18:0	41,73	4,00	3,98	3,99
Σ C18:1*	7,75	23,48	23,70	23,56
C18:2 n-6	9,01	22,01	22,20	21,92
C18:3 n-3	2,78	40,23	39,77	40,21
Σ NMK	80,08	13,48	13,53	13,56
Σ ENMK	8,05	24,14	24,36	24,22
Σ VNMK	11,86	62,38	62,11	62,22
Σ n-3 VNMK	2,85	40,33	39,86	40,31
Σ n-6 VNMK	9,01	22,05	22,25	21,92
n-6/n-3 VNMK	3,16	0,55	0,56	0,54

BDI – drezdušični izvleček; MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

* – vsota izomer C18:1 (oktadecenojske MK)

Imena skupin so razložena na strani 20

3.1.2 Živali

Poskus smo izvedli na kuncih slovenske mesne linije SIKa. V prehranski poskus smo vključili 48 kuncev (24 samic, 24 samcev), ki smo jih pri starosti 75 dni individualno naselili v žične kletke, opremljene s krmilniki in nipeljskim napajalnim sistemom. Povprečna uhlevitvena in začetna telesna masa živali sta prikazani v preglednici 9. Po petih

dneh prilagajanja, ko so živali dobivale standardno krmo, smo živali stehali, jih razdelili v štiri homogene (po spolu in telesni masi) poskusne skupine po 12 živali in jih krmili 22 dni. V času trajanja poskusa smo izločili samico iz skupine KONT + in samico iz skupine OLJKE zaradi zdravstvenih težav (žulji na nogah).

Preglednica 9: Povprečna telesna masa kuncev ob uhlevitvi in na začetku poskusnega obdobja (g)
Table 9: Mean live weight of rabbits at the beginning of the experimental period (g)

	Uhlevitvena masa		Začetna masa	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
KONT - (n = 12)	2420,50	380,45	2573,83	375,94
KONT + (n = 11)	2383,82	261,55	2588,55	279,96
GOBE (n = 12)	2418,83	280,58	2562,67	302,83
OLJKE (n = 11)	2414,00	263,14	2594,91	259,35

Imena skupin so razložena na strani 20

Kunce smo stehali ob namestitvi v individualne kletke, na začetku poskusa in nato enkrat na teden do konca poskusnega obdobja spremljali priraste. Krmili smo jih vsak dan med 8. in 9. uro in hkrati dnevno beležili porabo krme. Dnevno smo spremljali tudi vlago in temperaturo v prostoru in pregledovali stanje živali. Na koncu poskusa smo živali električno omamili in jih izkrcavali, pri čemer smo odvzeli tudi različne vzorce tkiv za laboratorijske analize.

3.1.3 Odvzem in zbiranje vzorcev

3.1.3.1 Seč

V času trajanja poskusa smo 6 kuncev iz vsake skupine za tri dni prestavili v metabolne kletke in 48 ur zbirali seč za določitev koncentracije malondialdehida (MDA) v seču. Po končanem obdobju zbiranja smo alikvote vzorcev seča posamezne živali do začetka analiz shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.3.2 Kri

Vzorce krvi smo odvzeli ob klanju živali. Shranili smo jih v vakuumске epruvete BD (Becton Dickinson and Company, ZDA). Glede na zahteve analize smo uporabili epruvete z različnimi antikoagulantmi:

- kometni test: BD 368841 (2 ml), antikoagulant EDTA
- vitamin E (tokoferoli): BD 367864 (6 ml), antikoagulant EDTA
- MDA: BD 368886 (6 ml), antikoagulant Li heparin

Vzorci krvi smo po odvzemu in med transportom hranili v hladnem in temnem prostoru. Epruvete z vzorci za kometni test smo dodatno zavili v aluminijevo folijo (preprečitev dostopa UV-žarkov in s tem poškodb celic). Postopek izolacije levkocitov in določitev poškodb DNA levkocitov (kometni test), smo opravili najkasneje eno uro po odvzemu krvi.

Za določitev koncentracije vitamina E smo kri centrifugirali 15 minut pri $1000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za določitev MDA smo kri v heparinskih epruvetah centrifugirali 10 minut pri $3000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugiranju smo dobljeno plazmo prenesli v 1,5 ml Eppendorfove epruvete in jih do analiz shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

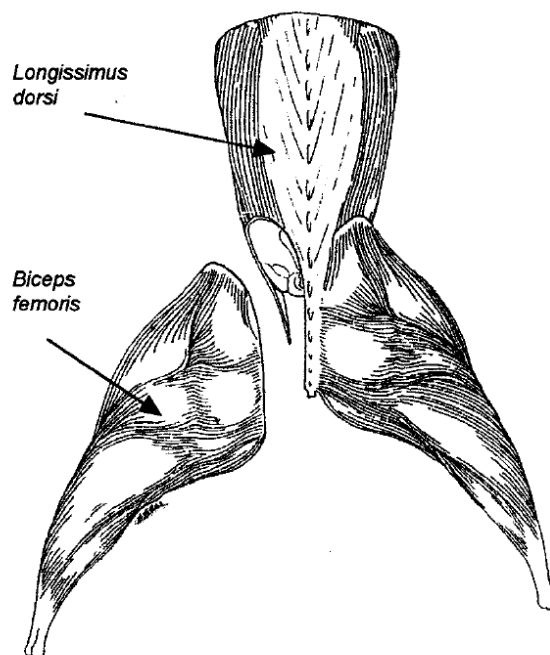
3.1.3.3 Vzorci jeter in prebavil

Po izkrvavitvi smo pripravili trupe tako, da smo kuncem odstranili kožo, rep, končne dele nog, glavo in urogenitalni trakt. Odvzeli smo celotna jetra, jih stehtali in shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prav tako smo iz trupov odstranili prebavila, od katerih smo za histološke analize odvzeli vzorce delov tankega in slepega črevesa. Shranili ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo tudi tkivo in vsebino tankega črevesa za določitev antioksidacijske kapacitete v maščobah in v vodi topnih antioksidantov.

3.1.3.4 Vzorci mišic in maščobe

Po zakolu smo trupe hladili 24 ur pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nato odvzeli še ostale vzorce. Pri tem smo izmerili še barvo in pH vrednost mesa hrbtna mišice.

Iz trupov smo odstranili abdominalno maščobo, jo stehtali in shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odvzeli smo tudi mišico zadnje noge (dvoglava stegenska mišica, *Biceps femoris*) in mišico ledvenega dela hrbta (najdaljša hrbtna mišica, *M. longissimus dorsi*) (slika 6).



Slika 6: Anatomska lokacija odvzetih vzorcev mišic (Hulot in Ouhayoun, 1999)
Figure 6: Anatomical location of muscles samples (Hulot and Ouhayoun, 1999)

Vzorci stegenske mišice smo shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, posamezne vzorce hrbtne mišice pa smo razdelili na sedem enako velikih delov in jih shranili na različne načine. En del hrbtne mišice smo shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ za nadaljnje analize, šest delov pa smo shranili za spremljanje lipidne oksidacije mesa. Lipidno oksidacijo mesa hrbtne mišice smo spremljali v svežem, toplotno obdelanem in skladiščnem mesu. Meso, ki je bilo namenjeno toplotni obdelavi, smo shranili v 50 ml plastičnih centrifugirkah s pokrovčkom, da smo ga lahko kasneje kuhali, ostale surove vzorce mesa pa smo shranili v polietilenske vrečke (PE-LD 04) z zapiralom, iz katerih smo pred zapiranjem iztisnili zrak. Surovo in kuhano meso smo skladiščili na tri načine in sicer sveže meso (neskladiščeno; do analiz shranjeno na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), shranjeno 6 dni v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter shranjeno 3 mesece v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Ss sveže, surovo meso
- Sk sveže, kuhano meso
- H6s skladiščeno v hladilniku 6 dni, surovo meso
- H6k skladiščeno v hladilniku 6 dni, kuhano meso
- Z3s skladiščeno v zamrzovalniku 3 mesece, surovo meso
- Z3k skladiščeno v zamrzovalniku 3 mesece, kuhano meso

Po preteku skladiščenja smo kuhane vzorce pridobili z enournim kuhanjem v vodni kopeli (LCS 0081 Lauda, Bartelt GmbH, Graz, Avstrija) pri temperaturi $85\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vse vzorce (jetra, abdominalna maščoba, stegenska in hrbtna mišica) smo pred začetkom analiz oziroma po končanem postopku skladiščenja in/ali toplotne obdelave homogenizirali s tekočim dušikom v laboratorijskem homogenizatorju (Grindomix GM200, Retsch GmbH and Co., Haan, Nemčija).

3.2 DOLOČANJE POŠKODB DNA LEVKOCITOV – KOMETNI TEST

Za izolacijo mononuklearnih celic (levkocitov) in izvedbo kometnega testa smo uporabili naslednje reagente in kemikalije:

- tekoči medij RPMI-1640 (Sigma R-8758)
- FBS (telečji serumski albumin) (Sigma F-2442)
- NH_4Cl , KHCO_3 , NaCl , KCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4
- Na_2EDTA (Sigma E-5134)
- NMP agarosa (Agarose Routine Use) (Sigma A-9539)
- LMP agarosa (Agarose Low Melting Use) (Sigma A-9414)
- Trizma Base (Sigma T-8524)
- DMSO (dimetil sulfoksid) (Sigma D-8779)
- N-lavrilsarkozinat (Sigma L-5777)
- Triton X-100 (Sigma T-9284)
- EtBr (Etidijev bromid)

Za pripravo raztopin smo uporabili prečiščeno deionizirano vodo Milli Q (MQ), ki smo jo deionizirali s pomočjo aparata Millipore ELIX 10.

3.2.1 Izolacija mononuklearnih celic iz krvi

Mononuklearne celice smo izolirali po metodi, ki sta jo opisala Johnstone in Thorpe (1990). Celice smo izolirali sterilno, z najmanjšim možnim izpostavljanjem svetlobi (delo je potekalo v laminariju, centrifugirke, minigele, elektroforetske kadi smo pokrili z Al-folijo), da smo preprečili dodatne poškodbe DNA z UV žarki. Po omenjenem protokolu izolirane mononuklearne celice so v večini levkociti.

V centrifugirki smo nežno zmešali 0,5 ml krvi s 4,5 ml tekočega medija RPMI-1640 in 0,5 ml FBS. Vzorce smo nato centrifugirali 5 minut pri $300 \times g$ in 4°C . Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli in sedimentu dodali 5 ml pufra za lizo eritrocitov ($\text{pH} = 7,2\text{--}7,4$), ki je imel naslednjo sestavo: 0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA . Nato smo suspenzije zavili v Al-folijo in jih rahlo stresali 5 minut. Ponovno je sledilo 5-minutno centrifugiranje pri $600 \times g$ in 4°C . Supernatant smo zavrgli in sedimentu dodali 4,5 ml

tekočega medija RPMI-1640 in 0,5 ml FBS. Vzorce smo ponovno centrifugirali 5 minut pri $600 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant smo zavrgli in sedimentu dodali 0,5 ml 10 mM PBS (pH = 7,2–7,4) s sestavo 1,369 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH_2PO_4 in 81 mM Na_2HPO_4 ter suspenzijo rahlo stresali. Izolirane celice levkocitov smo v nadaljevanju postopka dodali v LMP agarozo v razmerju 1 : 4 (0,5 ml suspenzije levkocitov + 1,5 ml LMP agaroze).

3.2.2 Postopek kometnega testa

Kometni test, ki ga izvajamo v našem laboratoriju, z manjšimi modifikacijami (več slojev agaroze, daljši čas elektroforeze, manjša koncentracija EtBr), v glavnem sledi postopku po Singhu in sod. (1988). Izolirane celice levkocitov smo vključili v tretji sloj agaroznih gelov. Ob pripravi vzorcev poskusnih živali smo pripravili tudi vzorce za pozitivno kontrolo, pri čimer smo minigele pred alkalno celično lizo potopili v raztopino H_2O_2 in tako namerno povzročili poškodbe celic. Temu je sledila alkalna celična liza, elektroforeza, nevtralizacija, barvanje z EtBr, spiranje in mikroskopska analiza signalov.

3.2.2.1 Priprava minigelov na mikroskopskih objektnikih

- 1. sloj: 400 μl 1-% NMP agaroze (0,3 g NMP + 30 ml 10 mM PBS) smo s plastično razmazovalko enakomerno nanegli na označena hrapava objektna stekelca. Razmaze smo do naslednjega dne sušili na sobni temperaturi.
- 2. sloj: 700 μl 0,6-% NMP agaroze (0,18 g NMP + 30 ml 10 mM PBS) smo nanegli na posušen 1. sloj in jo enakomerno porazdelili po celotni površini s polaganjem drugega, gladkega objektnega stekelca. Gel smo 10 minut utrjevali na ledeni plošči.
- 3. sloj: Po 10 min smo previdno odstranili zgornja objektna stekelca in nanegli 600 μl tretjega sloja 0,6-% LMP agaroze (0,18 g LMP + 30 ml 10 mM PBS), v katero so bili primešani levkociti v razmerju 1 : 4 in jih pokrili z objektnim stekelcem. Tretji sloj smo pripravili eno uro prej in ga inkubirali v vodni kopeli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gele smo prekrili z gladkimi objektnimi stekelci in jih ponovno utrdili na ledeni plošči (10 minut), ki smo jo prekrili z Al-folijo, da smo preprečili poškodbe celic.
- 4. sloj: Po 10 min smo previdno odstranili zgornja objektna stekelca in nanegli še 500 μl zadnjega, četrtega sloja 0,5-% LMP agaroze (0,15 g LMP + 30 ml 10 mM PBS), ki smo jo hranili v vodni kopeli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gele smo prekrili z gladkimi objektnimi stekelci in jih ponovno utrdili na ledeni plošči (10 min), prekriti z Al-folijo.

Utrjenim gelom smo odstranili zgornja objektna stekelca in nadaljevali postopek kometnega testa z alkalno lizo celic.

3.2.2.2 Alkalna liza celic

Pred alkalno lizo smo štiri objektna stekelca potopili v 500 μ M raztopino H_2O_2 (30 μ l 30-% H_2O_2 / 500 ml 10 mM PBS) pri 4 °C za 3 minute, kar je predstavljalo pozitivno kontrolo (načrtna poškodba celic) in hkrati kontrolo pravilne izvedbe kometnega testa. Po spiranju z 10 mM PBS smo jih skupaj z ostalimi minigeli položili v ohlajeno raztopino za alkalno lizo celic, ki je bila sestavljena iz: 1,2 M NaCl, 0,03 M NaOH, 10-% DMSO, 1-% Triton X-100 in 0,5-% N-lavrilsarkozinata. Alkalna liza celic je potekala 1 uro pri temperaturi 4 °C (v hladilniku).

3.2.2.3 Odvijanje superzvite DNA v elektroforetskem pufru

Alkalni lizi celic je sledilo odvijanje superzvite DNA v elektroforetskem pufru, ki smo ga pripravili tik pred uporabo iz osnovnih raztopin elektroforetskega pufra (10 M NaOH in 1 M EDTA). Delovna raztopina elektroforetskega pufra je vsebovala 30 mM NaOH in 2 mM EDTA. Minigele smo v ohlajeni delovni raztopini elektroforetskega pufra spirali eno uro v temi pri 4 °C in pri tem 3-krat zamenjali raztopino. Za elektroforezo smo uporabili štiri večje elektroforetske kadi (Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia Biotech) in izvor napetosti *Power Supply* EPS 601. Minigele smo zložili v elektroforetske kadi, jih prelili z ohlajenim elektroforetskim pufrom in pokrili s pokrovi in Al-folijo. V vsako elektroforetsko kad smo položili en gel z načrtno poškodovanimi celicami (pozitivna kontrola), ki je služil za potrditev pravilnega delovanja elektroforetske kadi. Elektroforeza je potekala 20 minut v temi pri 25 V in 300 mA.

3.2.2.4 Nevtralizacija

Po končani elektroforezi smo minigele nevtralizirali s 400 mM Tris-HCl pufersko raztopino, ki smo jo pripravili iz osnovne 1 M Tris-HCl raztopine (pH = 7,5). Minigele smo namakali 15 minut v temi, pri čemer smo 3-krat zamenjali pufer.

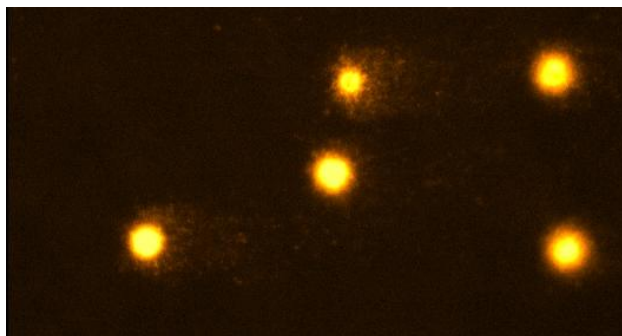
3.2.2.5 Barvanje jedrne DNA z etidijevim bromidom (EtBr) in spiranje

Za barvanje jedrne DNA smo 80 μ l osnovne raztopine EtBr (10 mg/ml) redčili v 400 ml 400 mM Tris-HCl pufra (končna koncentracija je bila 2 μ g/ml). Barvanje je potekalo v temi 10 minut pri 4 °C. Po končanem barvanju smo minigele spirali v 400 mM Tris-HCl pufru 10 minut v temi.

3.2.2.6 Analiza signalov in ocenjevanje poškodb celic

Poškodbe jedrne DNA smo ocenili z uporabo fluorescenčnega mikroskopa (Olympus CH 50, Japonska) pod 200-kratno povečavo pri ekscitacijski svetlobi valovne dolžine med 515

in 560 nm in emisijskem filtru 590 nm. S pomočjo kamere Hamamatsu Orca 2 (Japonska) smo sliko prenesli na računalniški ekran (slika 7) in z računalniškim programom Komet 5 (Single Cell Gel Electrophoresis, Kinetic Imaging Ltd., 2000, VB) ocenili poškodbe jedrne DNA (slika 8).



Slika 7: Primeri različno poškodovanih jedrnih DNA levkocitov
Figure 7: Examples of different damaged leukocyte nuclear DNA



Slika 8: Primer jedrne DNA levkocita, vidne s postopkom kometnega testa
Figure 8: The example of leukocyte nuclear DNA as seen by the comet assay

Za vsak vzorec smo ocenili poškodbe 100 naključno izbranih celičnih jeder. S pomočjo posebej pripravljenih makrojev programa Microsoft Excel smo naredili osnovno statistiko za dva parametra:

- % DNA v repu kometa: predstavlja razliko med celotnim fluorescenčnim signalom in signalom v glavi kometa (predstavlja poškodovano DNA).
- OTM: repni moment po Olivu (Olive in sod., 1992) predstavlja razliko med centrom v repu in centrom v glavi kometa, pomnoženo z intenzivnostjo signala v repu in vse skupaj deljeno z intenzivnostjo signala celotnega kometa. OTM nima enot, večje vrednosti pa pomenijo večje poškodbe.

Poškodbe DNA levkocitov v vseh štirih poskusnih skupinah smo izračunali na osnovi omenjenih dveh parametrov.

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE MALONDIALDEHIDA

Za določanje koncentracije malondialdehida (MDA) v plazmi, seču, jetrih, hrbtni in stegenski mišici ter različno shranjenih vzorcih mesa smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). S fosforno (H_3PO_4) ali trikloroacetno kislino (TCA) smo iz vzorcev sprostili MDA. Pri derivatizaciji MDA s tiobarbiturno kislino (TBA) nastane med segrevanjem pri 95 °C rožnat kompleks, ki ga tvorijo molekule TBA in MDA v razmerju 2 : 1.

Za določanje koncentracij MDA smo uporabili naslednje reagente in kemikalije:

- H_3PO_4 (fosforna (V) kislina) (Merck 100552)
- TCA (trikloroacetna kislina) (Merck 1.08178)
- BHT (butilirani hidroksi toluen) (Fluka 34750)
- abs. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (absolutni etanol) (Merck 1.00983.1000)
- TBA (2-tiobarbiturna kislina) (Fluka 88481)
- TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropan) (Fluka 86570)
- CH_3OH (metanol za tekočinsko kromatografijo) (Merck 1.06007.2500)
- KH_2PO_4 (kalijev dihidrogen fosfat) (Merck 1.05108.0500)
- KOH (kalijev hidroksid) (Merck 105021)

Za pripravo raztopin smo uporabili vodo MQ.

3.3.1 Določanje koncentracije MDA v plazmi in seču

Za določitev koncentracije MDA v plazmi in seču smo uporabili metodo, ki jo navajajo Wong in sod. (1987), z modifikacijami po Chirico (1994), Fukunaga in sod. (1995) in nekaterimi lastnimi modifikacijami.

Vzorci smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v 1,5 ml Eppendorf epruvete odpipetirali:

- 100 μl 0,44 M raztopine H_3PO_4
- 10 μl 0,2-% raztopine BHT v absolutnem etanolu
- 100 μl (seč) oziroma 200 μl (plazma) vzorca, standarda ali vode MQ (pri slepem vzorcu)

Pripravljeno mešanico smo dobro premešali na vrtinčniku in pustili stati 15 minut. Dodali smo 300 μl (seč) oziroma 600 μl (plazma) absolutnega etanola in ponovno dobro premešali. Pripravljene vzorce, brez standardov in slepih vzorcev, smo nato centrifugirali

15 minut pri $15.000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končanem centrifugiranju smo v Hachove epruvete odpipetirali:

- 1,5 ml 0,44 M raztopine H_3PO_4
- 350 μl (seč) oziroma 700 μl (plazma) centrifugiranega vzorca
- 500 μl 0,6-% raztopine TBA
- 900 μl (seč) oziroma 550 μl (plazma) vode MQ

Hachove epruvete smo zaprli s pokrovčki, dobro premešali in postavili v grelni termostatski blok za 60 minut pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po segrevanju smo vzorce ohladili pod tekočo vodo in jih z uporabo 5 ml brizg (BD Plastipak, Španija) in 0,2 μm filtrov (GRACE, IL) prefiltrirali v 2 ml vial (Chromacol) za avtomatski vzorčevalnik.

3.3.2 Določanje koncentracije MDA v jetrih, mišicah in mesu

Za določitev koncentracije MDA v homogeniziranih vzorcih jeter, mišic in mesa smo uporabili metodo po Vilà in sod. (2002) z manjšimi modifikacijami.

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v 1,5 ml Eppendorf epruvete dodali:

- 300 mg homogeniziranega vzorca (jetra, mišice, meso, vodo MQ pri slepem vzorcu)
- 1,5 ml 2,5-% TCA

Mešanico smo dobro premešali na vrtinčniku, da so delci razpadli, in jo pustili stati 10 minut. Potem smo vzorce še enkrat dobro premešali in jih centrifugirali 15 minut pri $15.000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končanem centrifugiranju smo v Hachove epruvete odpipetirali:

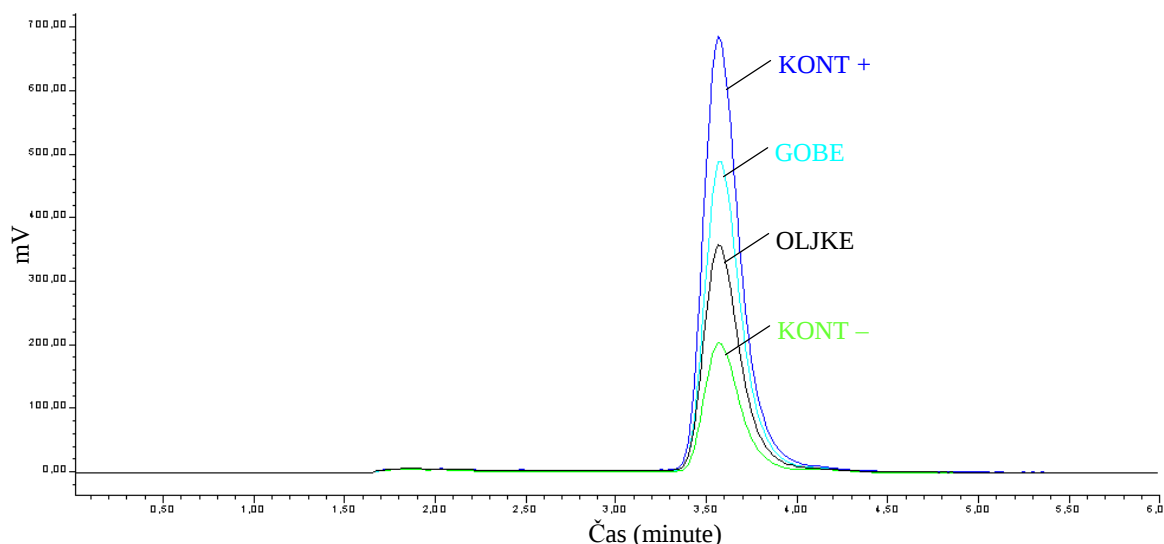
- 1 ml centrifugiranega vzorca (0,5 ml pri kuhanih vzorcih mesa)
- 1,5 ml 0,6-% TBA (vodna raztopina)
- 1 ml vode MQ

Hachove epruvete smo zaprli s pokrovčki, dobro premešali in postavili v grelni termostatski blok za 60 minut pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po segrevanju smo vzorce ohladili pod tekočo vodo in jih z uporabo 5 ml brizg (BD Plastipak, Španija) in 0,2 μm filtrov (GRACE, IL) prefiltrirali v 2 ml vial (Chromacol) za avtomatski vzorčevalnik.

3.3.3 Analiza vzorcev s tehniko HPLC

Derivat malondialdehida s tiobarbiturno kislino (MDA-TBA_2) smo določali s HPLC. Uporabili smo aparat Waters Alliance 2690 in Waters 474 Scanning fluorescenčni detektor

(ZDA). S programsko opremo Millenium³² Chromatography Manager (Waters, ZDA) smo ovrednotili rezultate. Ločevanje je potekalo na kromatografski koloni HyperClone 5 μm ODS (C_{18}) (120A, $4,6 \times 150$ mm; Phenomenex Inc., ZDA) s predkolono C_{18} ODS ($4 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$; Phenomenex Inc., ZDA).



Slika 9: Primer kromatograma določitve MDA v vzorcih mesa iz vseh poskusnih skupin
Figure 9: Example of chromatogram from MDA analysis of meat samples from all groups

Tehnični podatki za sliko 9:

Kolona:	HyperClone 5 μm ODS (C_{18}) 120A, $4,6 \times 150$ mm; Phenomenex Inc., ZDA
Predkolona:	C_{18} ODS $4 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ ID; Phenomenex Inc., ZDA
Mobilna faza:	35 % metanol, 65 % 50 mM KH_2PO_4 pufer (pH = 6,9)
Pretok:	1 ml/min
Čas analize:	6 min
Volumen injiciranja:	50 μl (plazma), 20 μl (seč), 30 μl (jetra, mišici)
Detektor:	Fluorescenčni detektor: λ_{vzb} = 515 nm, λ_{em} = 553 nm
Temperatura vzorcev:	4 °C
Temperatura kolone:	23 °C

Pri analizi vzorcev plazme smo na kolono injicirali 50 μl , pri analizi vzorcev seča 20 μl in pri analizi vzorcev jeter, mišic in mesa 30 μl pripravljene raztopine. Za analizo enega vzorca smo potrebovali 6 min. Kolona je bila na sobni temperaturi, vzorci v avtomatskem vzorčevalniku pa na 4 °C.

Za mobilno fazo smo uporabili mešanico metanola (MeOH) in 50 mM KH_2PO_4 pufra (pH = 6,9) v razmerju 35 : 65. Za uravnavo pH vrednosti pufra smo uporabili 1 M KOH. Pred uporabo smo s pomočjo vakuumske sesalne buče pufer prefiltrirali skozi 0,45 μm filter. Pretok mobilne faze je bil 1 ml/min.

Umeritveno krivuljo za določanje MDA-TBA₂ kompleksa smo pripravili s standardi TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropen) v koncentracijskem območju, ki je bilo odvisno od koncentracije MDA v vzorcih.

3.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE VITAMINA E

Koncentracijo izomer vitamina E (α - in γ -tokoferol) smo določali v plazmi, jetrih in obeh mišicah s HPLC po metodi, ki jo navajajo Abidi in Mounts (1997) in Rupérez in sod. (2001).

Za določanje koncentracije izomer vitamina E smo uporabili naslednje reagentne kemikalije:

- BHT (butilirani hidroksi toluen) (Fluka 34750)
- abs. C₂H₅OH (absolutni etanol) (Merck 1.00983.1000)
- CH₃(CH₂)₄CH₃ (heksan) (Merck 1.04391.1000)
- C₂H₅OH (etanol) (Merck 1.11727.1000)
- MeOH (metanol) (Sigma 34860)

3.4.1 Priprava vzorcev krvne plazme

Vzorci smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v Hachove epruvete odpipetirali:

- 250 μ l plazme (MQ pri slepem vzorcu)
- 1,5 ml etanola BHT (30 mg BHT / 100 ml etanola)
- 250 μ l vode MQ

Epruvete smo dobro zaprli, premešali vsebino s pomočjo vrtinčnika in nato vsebini dodali 1,5 ml heksana. Vsebino smo dobro premešali in epruvete v temi (zavite v Al-foliji), ročno stresali 10 minut. Sledilo je centrifugiranje 10 minut pri $5.000 \times g$ in 22 °C. Po končanem centrifugiranju smo v čisto Hachovo epruveto odpipetirali 1 ml heksanske faze in v toku dušika odparili heksan pri sobni temperaturi. Preostanek smo raztopili v 0,5 ml etanola, dobro premešali na vorteks mešalu in dobljene vzorce prenesli v vialo za HPLC avtomatski vzorčevalnik.

3.4.2 Priprava vzorcev jeter in mišic

Vzorci smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v Hachove epruvete zatehtali:

- 500–700 mg homogeniziranega vzorca (MQ pri slepem vzorcu)

- 2,0 ml etanola BHT (30 mg BHT / 100 ml etanola)
- 250 µl vode MQ

Epruvete smo dobro zaprli, premešali vsebino s pomočjo vrtinčnika in nato vsebini dodali 2,0 ml heksana. Vsebino smo dobro premešali in epruvete v temi (zavite v Al-foliji), ročno stresali 10 minut. Sledilo je centrifugiranje 10 minut pri $5.000 \times g$ in 22 °C. Po končanem centrifugiranju smo v čisto Hachovo epruveto odpipetirali 1 ml heksanske faze in v toku dušika odparili heksan pri sobni temperaturi. Preostanek smo raztopili v 1 ml etanola, dobro premešali na vorteks mešalu in dobljene vzorce prenesli v viala za HPLC avtomatski vzorčevalnik.

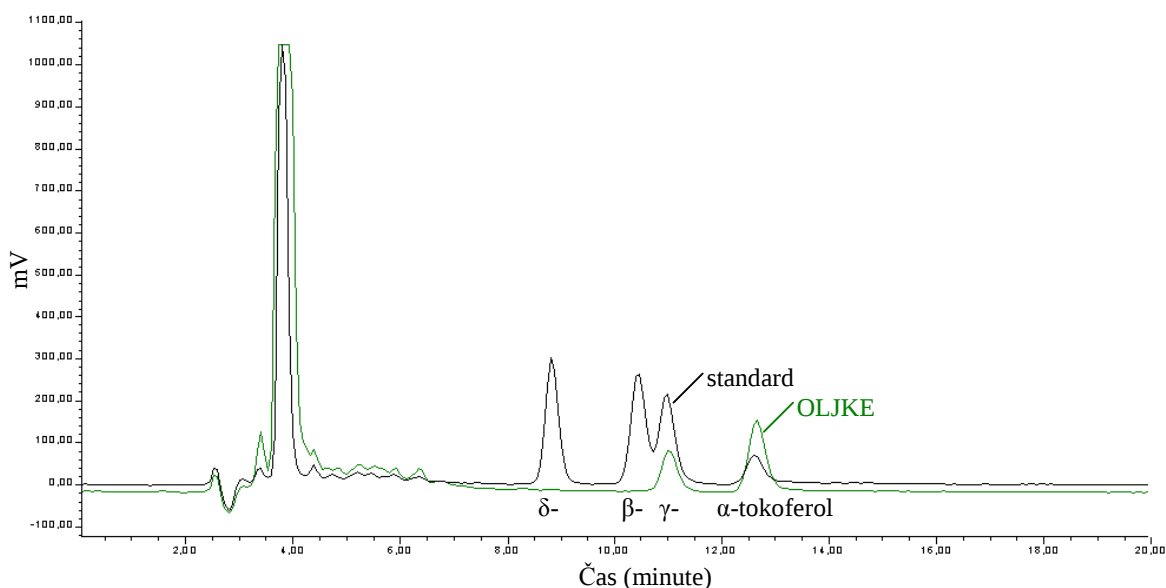
3.4.3 Analiza vzorcev s tehniko HPLC

Za določanje izomer vitamina E (α - in γ -tokoferol) smo uporabili HPLC. Uporabili smo aparat Waters Alliance 2690 in Waters 474 Scanning fluorescenčni detektor (ZDA). S programsko opremo Millenium³² Chromatography Manager (Waters, ZDA) smo ovrednotili rezultate. Ločevanje je potekalo na kromatografski koloni Luna 5u PFP(2) 100A, (250 × 4,6 mm; Phenomenex Inc., ZDA) in predkolono PFP (4 mm L × 3,0 mm ID; Phenomenex, ZDA).

Pri analizi vzorcev plazme smo na kolono injicirali 20 µl ter pri analizi vzorcev jeter in mišic 30 µl pripravljene raztopine. Za analizo enega vzorca smo potrebovali 20 min. Kolona in vzorci v avtomatskem vzorčevalniku so bili na sobni temperaturi.

Za mobilno fazo smo uporabili mešanico metanola (MeOH) in vode MQ v razmerju 95 : 5, pretok je bil 1,2 ml/min.

Umeritveno krivuljo za določanje izomer vitamina E smo pripravili s pomočjo seta tokoferolov (Tocopherol set 613424, Calbiochem). Koncentracija osnovnih standardov je bila 0,5 g/l. Pripravili smo jih v heksanu, ki je vseboval 30 mg BHT na 100 ml heksana, da bi preprečili oksidacijo. Osnovne standarde smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Delovni standard smo naredili tako, da smo v 100 ml bučko odpipetirali 0,5 ml posameznega tokoferola in do oznake razredčili z BHT heksanom. Koncentracija delovnega standarda je znašala 2,5 ppm za posamezen tokoferol.



Slika 10: Primer kromatograma določitve tokoferolov v vzorcu plazme iz skupine OLJKE in standarda
Figure 10: Example of chromatogram from tocopherol analysis of plasma sample from OLJKE group and one standard

Tehnični podatki za sliko 10:

Kolona:	Luna 5u PFP(2) 100A, (250 × 4,6 mm); Phenomenex Inc., ZDA
Predkolona:	PFP 4 mm L × 3 mm ID; Phenomenex Inc., ZDA
Mobilna faza:	95 % metanol, 5 % vode MQ
Pretok:	1,2 ml/min
Čas analize:	20 min
Volumen injiciranja:	20 µl (plazma), 30 µl (jetra, mišici)
Detektor:	Fluorescenčni detektor: $\lambda_{vzb} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 330 \text{ nm}$
Temperatura vzorcev:	23 °C
Temperatura kolone:	23 °C

3.5 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Maščobnokislinsko sestavo smo določili v jetrih, abdominalni maščobi in obeh mišicah. Za določanje smo uporabili plinsko kromatografijo po *in situ* transesterifikaciji maščob. Za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin smo uporabili metodo po Park in Goins (1994), brez predhodne ekstrakcije maščob iz vzorca.

3.5.1 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v epruvete z zamaškom zatehtali:

- 0,5–0,7 g (mišice, jetra) oziroma 0,1 g (maščoba) vzorca in dodali
- 300 µl CH_2Cl_2 (metilen klorid)
- 3 ml sveže pripravljenega 0,5 M NaOH v metanolu

Epruveto smo prepicali z dušikom (inertna atmosfera, za preprečitev oksidacije s kisikom iz zraka) in jo zaprli. Vsebino smo dobro premešali in postavili v grelni termostatski blok za 10 minut pri 90 °C (*in situ* transesterifikacija). Po segrevanju smo vzorce ohladili pod tekočo vodo in dodali 3 ml 14-% BF_3 v metanolu. Epruvete smo ponovno prepicali z dušikom, zaprli in postavili v grelni termostatski blok za 10 minut pri 90 °C. Epruvete smo po segrevanju hitro ohladili na sobno temperaturo in dodali 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Metilne estre maščobnih kislin smo s stresanjem epruvet ekstrahirali v nepolaro topilo. Reakcijsko zmes smo centrifugirali 10 minut pri $2.000 \times g$, s čemer smo ločili heksansko od vodne faze. Heksansko fazo smo nato s Pasteurjevo pipeto prenesli v temne stekleničke, jih prepicali z dušikom in zaprli s pokrovčki. Vzorce smo do začetka analiz shranili v zamrzovalni skrinji (−20 °C).

3.5.2 Analiza maščobnokislinske sestave s plinsko kromatografijo

Delež metilnih estrov maščobnih kislin smo določili s pomočjo plinske kromatografije. Uporabili smo plinski kromatograf Agilent 6890 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) opremljen z avtomatskim injektorjem in podajalnikom vzorcev, s plamensko ionizacijskim detektorjem in kapilarno kolono Omegawax 320 (Supelco, USA) s kemijsko vezano stacionarno fazo polietilenglikola (dolžina 30 m, notranji premer 0,32 mm, debelina filma stacionarne faze 0,25 μm). Injicirali smo 1 μl vzorca. Posamezne metilne estre maščobnih kislin smo identificirali na osnovi primerjave retencijskih časov v vzorcu z retencijskimi časi kromatografskih vrhov v standardnih raztopinah posameznih metilnih estrov (GLC 85, GLC 411, GLC 68A, Nu-Chek Prep, Elysian, ZDA). Rezultate smo izrazili kot odstotek od vseh maščobnih kislin.

3.6 MERJENJE BARVE IN pH VREDNOSTI MESA

Barvo in pH vrednost mesa hrbtne mišice smo merili po 24 urnem hlajenju. Barvo smo merili z aparatom Minolta CR 300 (Minolta camera, Osaka, Japonska), pri čemer smo uporabili svetlobni vir C in barvo izrazili kot vrednost CIE za svetel (L^*), rdeč (a^*) in rumen (b^*) odtenek. Vrednost pH smo merili s pomočjo aparata MA 130 Ion Meter (Mettler Toledo, Švica).

3.7 PREBAVILA

3.7.1 Histološka zgradba prebavil

3.7.1.1 Priprava tkivnih rezin

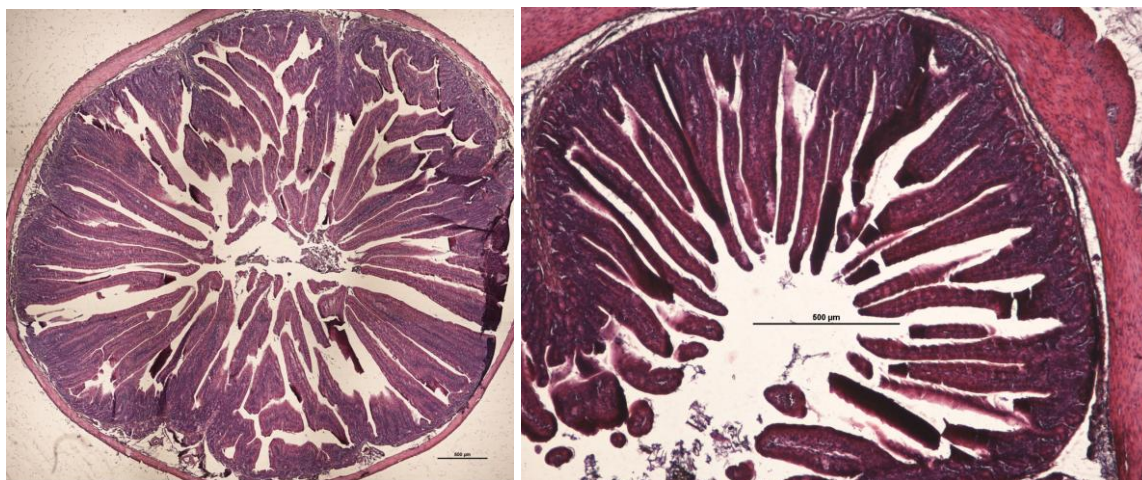
Odvzete dele tankega črevesa (dvanajstnik, tešče in vito črevo) ter slepo črevo smo fiksirali v 5-% raztopini puferiranega formalina. Odvzete vzorce smo zalili v parafinu in pripravili 5 μm stopničaste histološke rezine v razmiku 50 μm ter jih obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE).

Mesta odvzema posameznih delov črevesa:

- dvanajstnik (duodenum): končni del navzdolnjega dela dvanajstnika (*pars descendens duodeni*) pred *flexuro caudalis*
- tešče črevo (jejunum): srednji del jejunuma
- vito črevo (ileum): končni del ileuma pred njegovim razširjenim delom (*ampulla ilei*)
- slepo črevo (caecum): del slepega črevesa med prvo in drugo vijugo (*gyrus primus* in *gyrus secundus caeci*)

3.7.1.2 Morfometrična analiza črevesnih resic in intestinalnih žlez

Za morfometrično analizo smo uporabili tkivne rezine, obarvane s HE. Analize smo izvajali na slikah, posredovanih z mikroskopom in kamero na računalniški ekran (mikroskop Nikon Microphot FXA, opremljen z digitalno kamero (Nikon DS-Fi1, Japonska)). Z računalniškim programom NIS-Elements D 3.2 (Nikon, Japonska) smo izmerili višino črevesnih resic pri 4-kratni povečavi ter globino intestinalnih žlez pri 10-kratni povečavi objektiva.



Slika 11: Primer tkivnih rezin dvanajstnika in vitega črevesa
Figure 11: Example of histological sections of duodenum and ileum

3.7.2 Antioksidacijska kapaciteta v maščobah in v vodi topnih antioksidantov

Antioksidacijsko kapaciteto v maščobah in v vodi topnih antioksidantov smo merili v tkivu in vsebini tankega črevesa s pomočjo naprave PhotoChem (Analytic Jena, Jena, Nemčija). V maščobah topne antioksidante s to metodo določimo na osnovi spremljanja obsega inhibicije kemiluminiscenčnega signala zaradi antioksidantov v vzorcu, ki ga izračunamo iz razlike med površino signala pri neinhirani reakciji (brez antioksidantov, slepa vrednost) in površine signala delno inhibirane reakcije zaradi antioksidantov v vzorcu. Za

umerjanje aparata lahko uporabimo katerikoli v maščobah topni antioksidant. Osnova kvantitativnega določanja v vodi topnih antioksidantov pa je merjenje zastojnega časa (lag faze) reakcije med antioksidanti in superoksidnimi anionskimi radikali. Na začetku del superoksidnih anionskih radikalov nevtralizirajo antioksidanti v vzorcu (nizek signal na detektorju), ko se antioksidanti porabijo, začnejo presežni superoksidni anionski radikali reagirati z luminolom, pri čemer se sprošča svetloba (kemiluminiscenca), kar pomeni da se začne povečevati signal na detektorju. Tudi v tem primeru ni omejitve glede uporabe antioksidantov za kalibriranje.

3.7.2.1 Priprava vzorcev tkiva in vsebine tankega črevesa

Vzorci smo pripravili po metodi, ki jo navajajo McLean in sod. (2005), z nekaterimi lastnimi modifikacijami.

Vzorci smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah tako, da smo v Hachove epruvete zatehtali:

- 0,4 g (tkivo) oziroma 0,1 g (liofiliziran vzorec vsebine prebavil) vzorca
- 3 ml 5-% vodne raztopine NaCl in 100-% etanola v razmerju 1 : 1
- 3 ml heksana

Epruvete smo dobro zaprli in premešali vsebino na vrtinčniku. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri $4.000 \times g$. Po končanem centrifugiranju smo dobili ločeno vodno in heksansko fazo.

Heksansko fazo smo prenesli v drugo Hachovo epruveto, v prvo pa ponovno dodali 3 ml heksana za ekstrakcijo v maščobah topnih antioksidantov. Sledilo je ponovno mešanje in centrifugiranje pri enakih pogojih. Po končanem centrifugiranju smo heksansko fazo dodali v epruveto k prvi zbrani heksanski fazi. V toku dušika smo odparili heksan, preostanek pa raztopili v 0,2 ml heksana in z avtomatsko pipeto prenesli v 1,5 ml Eppendorf epruvete.

Vodno fazo, ki je ostala v (prvi) Hachovi epruveti, smo prenesli v Eppendorf epruvete. Sledilo je centrifugiranje 10 minut pri $15.000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končanem centrifugiranju smo supernatant prenesli v Eppendorf epruveto in ga razredčili z raztopino za ekstrakcijo (vodna raztopina NaCl in etanol).

3.7.2.2 Določanje antioksidacijske kapacitete

V maščobah topne antioksidante smo določili po navodilih proizvajalca (Protocol ACL) z uporabo reagentov ACL-Kit (Analytik Jena, Jena, Nemčija). V plastično posodico smo odpipetirali metanol in pufer ter vsebino dobro premešali na vrtinčniku. Dodali smo alikvot (5–40 μl) standarda (kalibriranje) ali heksanskega ekstrakta vzorca, ki smo ga premešali na

vrtničniku. Dodali smo še dobro premešan luminol, ponovno premešali, posodico takoj vstavili v aparat in pričeli z merjenjem. Shema pipetiranja pri določanju v maščobah topnih antioksidantov je prikazana v preglednici 10. Aparat smo umerili s standardno raztopino troloxa, vodotopnega analoga vitamina E. Rezultate meritev smo podali v nmol ekvivalentov troloxa v gramu vzorca.

Preglednica 10: Shema pipetiranja pri določanju v maščobah topnih antioksidantov

Table 10: Pipetting scheme for determination of the lipid soluble compounds

Reagent	Metanol (μl)	Pufer (μl)	Luminol (μl)	Trolox (μl)	Vzorec (μl)
Slepa	2300	200	25		
Kalibriranje	2300	200	25	5–40	
Vzorci	2300	200	25		10–40

V vodi topne antioksidante smo določili po navodilih proizvajalca (Protocol ACW) z uporabo reagentov ACW-Kit (Analytik Jena, Jena, Nemčija). V plastično posodico smo odpipetirali vodo MQ in pufer, raztopino smo premešali na vrtničniku, nato smo dodali alikvot (5–40 μl) standarda (kalibriranje) ali vzorca in vse skupaj dobro premešali na vrtničniku. Dodali smo še dobro premešan luminol, ponovno premešali, posodico takoj vstavili v aparat in pričeli z merjenjem. Shema pipetiranja pri določanju v vodi topnih antioksidantov je prikazana v preglednici 11. Aparat smo umerili s standardno raztopino askorbinske kisline. Rezultate meritev smo podali v μmol ekvivalentov askorbinske kisline v gramu vzorca.

Preglednica 11: Shema pipetiranja pri določanju v vodi topnih antioksidantov

Table 11: Pipetting scheme for determination of the water soluble compounds

Reagent	MQ voda (μl)	Pufer (μl)	Luminol (μl)	Askorbinska kisline (μl)	Vzorec (μl)
Slepa	1500	1000	25		
Kalibriranje	1500	1000	25	5–40	
Vzorci	1500	1000	25		10–40

3.8 STATISTIČNA ODBELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS, 2008). Normalnost porazdelitve smo testirali s proceduro UNIVARIATE, statistične parametre pa s proceduro MEANS. Za obdelavo podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Models). Razlike med skupinami smo ovrednotili s pomočjo linearnih kontrastov in Tukey testa. Razlike so bile statistično značilne pri $p \leq 0,05$.

V statistični model smo vključili sistematski vpliv skupine in z njim obdelali naslednje parametre:

- prirast
- zauživanje krme
- izkoriščanje krme
- stopnjo poškodb DNA levkocitov (OTM in % DNA v repu kometa)
- koncentracijo MDA v seču, plazmi, jetrih in mišicah
- koncentracijo MDA v mesu, shranjenem in obdelanem na različne načine
- maščobnokislinsko sestavo mišic, jeter in maščobnega tkiva
- koncentracijo vitamina E (α - in γ -tokoferol) v plazmi, jetrih in mišicah
- barvo in pH vrednost mesa
- histologijo prebavil (tanko in slepo črevo)
- antioksidacijsko kapaciteto tankega črevesa

Statistični model:

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

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

e_{ij} = ostanek

4 REZULTATI

V času poskusa nismo zabeležili pogina. Zbiranje vzorcev in analitski postopki so potekali brez posebnosti.

4.1 PROIZVODNI REZULTATI

V preglednici 12 so prikazani proizvodni rezultati. Vidimo, da med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v začetni in končni telesni masi, kar pomeni, da se tudi prirast med skupinami ni statistično razlikoval. Prav tako ni bilo razlik v zauživanju in izkoriščanju krme.

Preglednica 12: Proizvodni rezultati kuncev iz različnih poskusnih skupin

Table 12: Performance of rabbits from different experimental groups

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Začetna telesna masa (g)	2574	2589	2563	2595	93,3	0,994
Končna telesna masa (g)	3235	3362	3303	3396	102,7	0,689
Prirast (g/dan)	28,8	33,6	32,2	34,8	2,19	0,225
Zauživanje krme (g/dan)	168,3	178,5	168,7	174,7	5,46	0,477
Izkoriščanje krme (g/g)	6,09	5,66	5,39	5,18	0,37	0,322

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.2 STOPNJA POŠKODB DNA LEVKOCITOV

Stopnja poškodb DNA levkocitov, merjena z OTM, se med skupinami ni statistično razlikovala. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik, če smo poškodbe DNA levkocitov merili kot % DNA v repu kometa (preglednica 13).

Preglednica 13: Poškodbe DNA levkocitov, predstavljene kot OTM (repni moment po Olivu) in kot % DNA v repu kometa

Table 13: Leukocytes DNA damage presented as OTM (Olive Tail Moment) and as % DNA in the tail of the comet

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
OTM	1,98	2,37	1,95	2,48	0,33	0,594
% DNA v repu kometa	9,98	10,42	9,99	10,50	0,77	0,945

OTM – repni moment po Olivu

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.3 KONCENTRACIJA MALONDIALDEHIDA

4.3.1 Koncentracija MDA v seču, plazmi, jetrih in mišicah

Rezultati niso pokazali vpliva vrste uporabljenih maščob ter dodatkov na koncentracijo MDA v seču in plazmi, razlike pa smo ugotovili v jetrih in obeh mišicah (preglednica 14), kjer je dodatek lanenega olja statistično značilno zvišal koncentracijo MDA. Z dodatkom gob in oljčnih listov se je koncentracija MDA nekoliko znižala, vendar razlike v primerjavi s KONT + skupino niso bile statistično značilne.

Preglednica 14: Vsebnost malondialdehida v vzorcih seča, plazme, jeter in obeh mišic pri kuncih iz različnih poskusnih skupin

Table 14: Concentration of malondialdehyde in urine, plasma, liver and both muscles of rabbits from different experimental groups

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Seč (μmol/48 h)	2,87	2,63	2,50	2,76	0,24	0,711
Plazma (nmol/ml)	0,14	0,14	0,15	0,13	0,01	0,777
Jetra (nmol/g)	1,05 ^a	2,20 ^b	1,79 ^b	1,50 ^{ab}	0,19	0,001
Mišici (nmol/g)						
stegenska mišica	3,42 ^a	12,13 ^b	10,79 ^b	11,18 ^b	1,06	<0,001
hrbta mišica	0,67 ^a	3,69 ^b	2,61 ^b	2,53 ^b	0,45	0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$
Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.3.2 Koncentracija MDA v mesu, obdelanem na različne načine

Razlike v vsebnosti MDA v mesu so bile med kontrolnima skupinama v vseh postopkih obdelave statistično značilne (preglednica 15). Koncentracija MDA je bila značilno višja pri živalih, ki so s krmo zauživale laneno olje. Dodatek gob in oljčnih listov ni statistično značilno izboljšal stabilnosti toplotno obdelanih vzorcev, kljub temu, da so bile vrednosti MDA nekoliko nižje kot pri skupini KONT +. Podobno tudi dodatek gob in oljčnih listov ni statistično značilno izboljšal oksidacijske stabilnosti pri surovih vzorcih v primerjavi s skupino KONT +. Lahko pa opazimo, da je dodatek gob v shranjenih vzorcih, tako v hladilniku kot tudi v zamrzovalniku, znižal koncentracijo MDA na raven, ki se ni statistično razlikovala od skupine, ki je s krmo zauživala palmovo mast. Podobno je dodatek oljčnih listov vplival na koncentracijo MDA v zamrznjenih vzorcih mesa. Koncentracije MDA so bile pričakovano nižje v surovih vzorcih v primerjavi s kuhanimi vzorci.

Preglednica 15: Koncentracija MDA (nmol/g) v vzorcih mesa, obdelanih na različne načine

Table 15: Concentration of MDA (nmol/g) in meat samples processed using different methods

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Ss	0,67 ^a	3,69 ^b	2,61 ^b	2,53 ^b	0,45	0,001
Sk	1,72 ^a	11,47 ^b	9,62 ^b	7,43 ^b	1,23	<0,001
H6s	0,93 ^a	13,99 ^b	8,28 ^{ab}	10,13 ^b	2,46	0,002
H6k	2,18 ^a	12,13 ^b	9,95 ^b	7,92 ^b	1,20	<0,001
Z3s	0,86 ^a	3,32 ^b	2,38 ^{ab}	2,56 ^{ab}	0,50	0,008
Z3k	2,32 ^a	10,84 ^b	8,25 ^b	7,04 ^b	1,20	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

Načini obdelave in shranjevanja vzorcev so razloženi na strani 28

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.4 KONCENTRACIJA VITAMINA E

V preglednici 16 so predstavljeni rezultati analiz vsebnosti izomer vitamina E v plazmi, jetrih in obeh mišicah. Vidimo, da se je v primeru dodajanja lanenega olja v krmo na splošno znižala vsebnost α -tokoferola in zvišala vsebnost γ -tokoferola v vzorcih. V plazmi se je ob dodajanju lanenega olja statistično značilno znižala vsebnost α -tokoferola, medtem ko pri γ -tokoferolu nismo izmerili razlik v vsebnosti. Skupina, ki je v krmi dobivala dodatek gob, je imela statistično značilno višjo vsebnost γ -tokoferola v plazmi v primerjavi s skupino KONT -. Z dodajanjem lanenega olja v krmo se je povečala vsebnost γ -tokoferola v jetrih živali in znižala vsebnost α -tokoferola. Skupina GOBE je imela prav tako nekoliko nižjo vsebnost α -tokoferola, vendar razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s skupino KONT -. Vsebnost α -tokoferola v hrbtni mišici se pri dodatku lanenega olja ni statistično značilno razlikovala od skupine, ki je s krmo zauživala palmovo mast. Sta pa dodatka gob in oljčnih listov statistično značilno znižala vsebnost α -tokoferola v primerjavi s skupino KONT -. Vsebnost γ -tokoferola se je z dodatkom lanenega olja značilno zvišala tako v hrbtni kot tudi v stegenski mišici. Dodatek lanenega olja pa je v stegenski mišici značilno znižal vsebnost α -tokoferola.

Preglednica 16: Vsebnost tokoferolov v plazmi, jetrih, hrbtni in stegenski mišici pri kuncih iz različnih poskusnih skupin

Table 16: Concentration of tocopherols in plasma, liver, back and leg muscle of rabbits from different experimental groups

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Plazma (µg/ml)						
α-tokoferol	6,69 ^a	4,01 ^b	4,86 ^b	4,26 ^b	0,35	<0,001
γ-tokoferol	0,59 ^a	0,72 ^a	0,89 ^b	0,70 ^a	0,06	0,003
Jetra (µg/g)						
α-tokoferol	11,21 ^a	8,48 ^b	9,42 ^{ab}	8,57 ^b	0,55	0,002
γ-tokoferol	1,24 ^a	1,68 ^b	1,92 ^b	1,66 ^b	0,09	<0,001
Hrbtna mišica (µg/g)						
α-tokoferol	3,99 ^a	3,27 ^{ab}	3,08 ^b	3,10 ^b	0,21	0,007
γ-tokoferol	0,46 ^a	0,77 ^b	0,71 ^b	0,67 ^b	0,03	<0,001
Stegenska mišica (µg/g)						
α-tokoferol	4,95 ^a	3,62 ^b	3,71 ^b	3,70 ^b	0,32	0,009
γ-tokoferol	0,73 ^a	1,03 ^b	1,03 ^b	0,99 ^b	0,05	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$
Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.5 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Vsebnost maščob in maščobnokislinsko sestavo smo določili v hrbtni (preglednica 17) in stegenski mišici (preglednica 18), jetrih (preglednica 19) in maščobnem tkivu živali (preglednica 20).

Vsebnost maščob v tkivih se med skupinami ni razlikovala. Maščobnokislinska sestava tkiv se je razlikovala med živalmi glede na vir maščobe, ki so ga dobivale v krmi. Živali, ki so s krmo zauživale laneno olje, so imele v vseh tkivih večje deleže VNМК, predvsem n-3 VNМК, in manjše deleže NMK. Vsebnost ENМК se, razen v jetrih, kjer se je znižala na račun VNМК, med skupinami ni razlikovala. Največjo vsebnost VNМК smo določili v jetrih. Povečana vsebnost n-3 VNМК v tkivih je vplivala na razmerje med n-6 in n-3 VNМК, ki je bilo v skupinah, ki so dobivale laneno olje, več kot trikrat ožje v primerjavi s skupino, ki je s krmo zauživala palmovo mast. Dodatek gob ali oljčnih listov ni bistveno vplival na maščobnokislinsko sestavo analiziranih tkiv.

Preglednica 17: Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava hrbtne mišice (% od vseh MK)

Table 17: Content of fat (g/100g) and fatty acid composition of back muscle (% of total fatty acids)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Maščoba	2,04	2,06	1,47	1,62	0,28	0,314
C12:0	0,15	0,09	0,14	0,11	0,02	0,057
C14:0	1,86 ^a	1,44 ^b	1,28 ^b	1,40 ^b	0,10	0,001
C16:0	23,21 ^a	17,31 ^b	17,66 ^b	17,62 ^b	0,34	<0,001
C16:1 n-7	3,48	2,64	2,41	2,55	0,45	0,319
C18:0	10,48 ^a	6,02 ^b	6,84 ^b	6,49 ^b	0,33	<0,001
Σ C18:1	23,38	23,50	22,76	23,12	0,30	0,286
C18:2 n-6	23,91	24,25	24,30	24,17	0,50	0,940
C18:3 n-3	3,15 ^a	14,68 ^b	12,50 ^b	13,48 ^b	0,74	<0,001
C20:4 n-6	4,12	3,43	4,44	3,91	0,39	0,309
C20:5 n-3	0,14 ^a	0,39 ^b	0,45 ^b	0,41 ^b	0,04	<0,001
C22:5 n-3	0,63 ^a	1,11 ^b	1,36 ^b	1,23 ^b	0,11	<0,001
C22:6 n-3	0,11 ^a	0,15 ^{ab}	0,19 ^b	0,17 ^{ab}	0,02	0,005
Σ NMK	38,52 ^a	27,50 ^b	28,98 ^b	28,43 ^b	0,53	<0,001
Σ ENMK	27,80	27,06	26,11	26,60	0,74	0,397
Σ VNMK	33,68 ^a	45,44 ^b	44,91 ^b	44,97 ^b	0,85	<0,001
Σ n-3 VNMK	4,07 ^a	16,52 ^b	14,68 ^b	15,50 ^b	0,68	<0,001
Σ n-6 VNMK	29,59	28,90	30,21	29,45	0,65	0,546
n-6/n-3 VNMK	7,28 ^a	1,81 ^b	2,11 ^b	1,96 ^b	0,13	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

Preglednica 18: Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava stegenske mišice (% od vseh MK)

Table 18: Content of fat (g/100g) and fatty acid composition of leg muscle (% of total fatty acids)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Maščoba	5,53	5,42	4,92	3,89	0,77	0,468
C12:0	0,20	0,16	0,20	0,18	0,02	0,206
C14:0	1,92 ^a	1,47 ^b	1,35 ^b	1,42 ^b	0,08	<0,001
C16:0	22,69 ^a	16,52 ^b	16,54 ^b	16,87 ^b	0,34	<0,001
C16:1 n-7	2,92	2,09	1,90	1,83	0,32	0,065
C18:0	10,86 ^a	6,09 ^b	7,80 ^b	6,56 ^b	0,38	<0,001
Σ C18:1	23,15	23,01	22,40	22,71	0,34	0,383
C18:2 n-6	27,83	28,06	29,00	28,38	0,54	0,416
C18:3 n-3	3,99 ^a	16,26 ^b	14,69 ^b	15,32 ^b	0,67	<0,001
C20:4 n-6	1,85	1,60	1,96	1,78	0,14	0,310
C20:5 n-3	0,06 ^a	0,18 ^b	0,19 ^b	0,18 ^b	0,01	<0,001
C22:5 n-3	0,33 ^a	0,59 ^b	0,68 ^b	0,64 ^b	0,05	<0,001
C22:6 n-3	0,06 ^a	0,08 ^{ab}	0,10 ^b	0,09 ^b	0,01	0,003
Σ NMK	37,97 ^a	26,37 ^b	27,26 ^b	27,29 ^b	0,50	<0,001
Σ ENMK	26,82	25,85	24,99	25,19	0,67	0,192
Σ VNMK	35,21 ^a	47,78 ^b	47,75 ^b	47,52 ^b	0,73	<0,001
Σ n-3 VNMK	4,50 ^a	17,26 ^b	15,81 ^b	16,43 ^b	0,68	<0,001
Σ n-6 VNMK	30,68	30,48	31,92	31,06	0,65	0,396
n-6/n-3 VNMK	6,82 ^a	1,81 ^b	2,09 ^b	1,95 ^b	0,13	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

Preglednica 19: Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava jeter (% od vseh MK)
Table 19: Content of fat (g/100g) and fatty acid composition of liver (% of total fatty acids)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Maščoba	3,31	3,27	3,27	3,47	0,18	0,855
C12:0	0,04 ^a	0,02 ^b	0,04 ^{ab}	0,03 ^{ab}	0,01	0,026
C14:0	0,35 ^a	0,18 ^b	0,18 ^b	0,19 ^b	0,03	<0,001
C16:0	17,23 ^a	12,06 ^b	12,18 ^b	12,42 ^b	0,31	<0,001
C16:1 n-7	0,63 ^a	0,45 ^b	0,40 ^b	0,43 ^b	0,05	0,003
C18:0	24,55	23,74	23,44	23,56	0,36	0,119
Σ C18:1	13,34 ^a	11,00 ^b	11,15 ^b	10,83 ^b	0,38	<0,001
C18:2 n-6	30,50	31,19	30,88	31,31	0,29	0,204
C18:3 n-3	1,70 ^a	7,04 ^b	7,65 ^b	6,92 ^b	0,27	<0,001
C20:4 n-6	7,12	7,10	7,07	7,05	0,19	0,994
C20:5 n-3	0,15 ^a	0,46 ^b	0,45 ^b	0,43 ^b	0,03	<0,001
C22:5 n-3	0,44 ^a	1,51 ^b	1,50 ^b	1,52 ^b	0,06	<0,001
C22:6 n-3	0,17 ^a	0,61 ^b	0,56 ^b	0,59 ^b	0,03	<0,001
Σ NMK	43,29 ^a	37,75 ^b	37,60 ^b	37,96 ^b	0,38	<0,001
Σ ENMK	14,40 ^a	11,85 ^b	11,96 ^b	11,68 ^b	0,42	<0,001
Σ VNMK	42,31 ^a	50,40 ^b	50,45 ^b	50,36 ^b	0,25	<0,001
Σ n-3 VNMK	2,54 ^a	9,96 ^b	10,49 ^b	9,83 ^b	0,31	<0,001
Σ n-6 VNMK	39,75	40,43	39,96	40,52	0,32	0,262
n-6/n-3 VNMK	15,81 ^a	4,11 ^b	3,88 ^b	4,17 ^b	0,31	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

Preglednica 20: Vsebnost maščob (g/100 g) in maščobnokislinska sestava maščobe (% od vseh MK)

Table 20: Content of fat (g/100g) and fatty acid composition of adipose tissue (% of total fatty acids)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Maščoba	87,03	88,08	90,73	90,67	2,04	0,491
C12:0	0,19	0,15	0,18	0,16	0,02	0,431
C14:0	1,75 ^a	1,24 ^b	1,22 ^b	1,25 ^b	0,06	<0,001
C16:0	24,81 ^a	15,86 ^b	15,76 ^b	16,12 ^b	0,37	<0,001
C16:1 n-7	2,18	1,73	1,51	1,51	0,20	0,062
C18:0	14,06 ^a	5,43 ^b	5,71 ^b	5,63 ^b	0,32	<0,001
Σ C18:1	23,66 ^a	24,71 ^b	24,26 ^{ab}	24,41 ^{ab}	0,25	0,028
C18:2 n-6	25,72 ^a	27,23 ^a	28,95 ^b	27,92 ^a	0,60	0,003
C18:3 n-3	4,21 ^a	20,31 ^b	18,93 ^b	19,61 ^b	0,72	<0,001
C20:4 n-6	0,14	0,14	0,14	0,13	0,01	0,415
C20:5 n-3	0,01 ^a	0,03 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b	0,01	<0,001
C22:5 n-3	0,06 ^a	0,11 ^b	0,11 ^b	0,11 ^b	0,01	<0,001
Σ NMK	42,72 ^a	24,41 ^b	24,76 ^b	24,96 ^b	0,59	<0,001
Σ ENMK	26,58	27,13	26,42	26,56	0,41	0,614
Σ VNMK	30,70 ^a	48,47 ^b	48,83 ^b	48,49 ^b	0,67	<0,001
Σ n-3 VNMK	4,36 ^a	20,65 ^b	19,26 ^b	19,96 ^b	0,72	<0,001
Σ n-6 VNMK	26,30 ^a	27,79 ^{ab}	29,52 ^b	28,49 ^{ab}	0,62	0,004
n-6/n-3 VNMK	6,02 ^a	1,40 ^b	1,58 ^b	1,45 ^b	0,10	<0,001

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

MK – maščobne kisline; NMK – nasičene MK; ENMK – enkrat nenasičene MK; VNMK – večkrat nenasičene MK

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.6 BARVA IN pH VREDNOST MESA

Rezultati merjenja barve in pH vrednosti mesa hrbtne mišice so prikazani v preglednici 21. pH vrednost je bila pri živalih, krmljenih z dodanim lanenim oljem, statistično značilno nižja kot pri kontrolni skupini, ki smo ji dodali palmovo mast. Dodatek gob in oljčnih listov ni vplival na pH vrednost. Dodatek lanenega olja v krmo je vplival na svetel in rumen odtenek mesa. Skupini KONT + in GOBE sta imeli statistično značilno svetlejšo meso kot skupina KONT -. Tudi meso skupine OLJKE je bilo svetlejšo, vendar razlika ni bila statistično značilna. Vse skupine, krmljene z dodanim lanenim oljem, so imele bolj rumenkasto obarvano meso, je pa dodatek gob in oljčnih listov povzročil statistično značilno znižanje rumenega odtenka v primerjavi s skupino KONT +. Pri rdečem odtenku med skupinami ni bilo statističnih razlik.

Preglednica 21: Barva mesa, izražena kot vrednosti CIE za svetel (L*), rdeč (a*) in rumen (b*) odtenek, ter pH vrednosti mesa

Table 21: Colour of meat expressed in terms of CIE values for lightness (L*), redness (a*) and yellowness (b*) and pH values of meat samples

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
pH	5,95 ^a	5,78 ^b	5,75 ^b	5,77 ^b	0,03	<0,001
Svetel odtenek (L*)	52,79 ^a	56,56 ^b	55,88 ^b	54,62 ^{ab}	0,85	0,013
Rdeč odtenek (a*)	2,78	3,20	2,93	3,35	0,34	0,605
Rumen odtenek (b*)	0,98 ^a	1,87 ^b	1,26 ^a	1,28 ^a	0,23	0,052

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$
Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.7 PREBAVILA

4.7.1 Histologija prebavil

Med skupinami ni bilo razlik v višini črevesnih resic in globini intestinalnih žlez na različnih delih tankega črevesa (preglednica 22). Prav tako ni bilo razlik v globini intestinalnih žlez v slepem črevesu.

Preglednica 22: Višina črevesnih resic (μm), globina intestinalnih žlez (μm) in njuno razmerje na različnih delih tankega črevesa in globina intestinalnih žlez v slepem črevesu (μm)
Table 22: Villus height (μm), crypts depth (μm) and villus/crypts ratio in individual parts of the small intestine and crypts depth in the caecum (μm)

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Dvanajstnik						
resice	1305,78	1425,95	1395,29	1402,27	43,14	0,216
žleze	118,00	112,23	117,83	113,76	4,98	0,786
resice/žleze	11,25	12,67	12,17	12,56	0,56	0,269
Tešče črevo						
resice	810,78	743,59	809,66	748,91	43,49	0,526
žleze	107,00	97,03	107,38	110,18	5,28	0,323
resice/žleze	7,75	7,75	7,67	6,86	0,44	0,396
Vito črevo						
resice	697,50	673,92	686,34	659,89	20,38	0,583
žleze	124,55	116,97	125,51	121,20	4,43	0,508
resice/žleze	5,67	5,83	5,53	5,52	0,26	0,805
Slepo črevo						
žleze	66,61	63,27	66,66	64,01	2,11	0,530

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

4.7.2 Antioksidacijska kapaciteta prebavil

Med skupinami ni bilo razlik v antioksidacijski kapaciteti v maščobah in v vodi topnih antioksidantov v tkivu in v antioksidacijski kapaciteti v vodi topnih antioksidantov v vsebini tankega črevesa (preglednica 23). Skupina, ki je s krmo zauživala palmovo mast, je imela višjo antioksidacijsko kapaciteto v maščobi topnih antioksidantov v vsebini prebavil v primerjavi z ostalimi skupinami, vendar je bila razlika statistično značilna le pri skupinah, ki sta zauživali gobe in oljke.

Preglednica 23: Antioksidacijska kapaciteta v maščobah (ACL) in v vodi (ACW) topnih antioksidantov v tkivu in vsebini tankega črevesa

Table 23: Antioxidative capacity of the lipid (ACL) and of the water (ACW) soluble compound in small intestine tissue and content

	KONT -	KONT +	GOBE	OLJKE	SEM	p-vrednost
Tkivo tankega črevesa						
ACL *	20,9	18,9	22,9	23,2	2,05	0,433
ACW **	2,81	2,83	2,35	2,54	0,30	0,594
Vsebina tankega črevesa						
ACL *	94,0 ^a	79,0 ^{ab}	65,4 ^b	69,4 ^b	5,60	0,005
ACW **	5,41	4,03	7,12	8,29	1,58	0,252

^{a, b} vrednosti v vrstici, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

* nmol ekvivalentov troloxa/g vzorca; ** μ mol ekvivalentov askorbinske kisline/g vzorca

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V današnjem času se vse več ljudi zaveda pomena zdrave prehrane, zato porabniki povprašujejo po mesu in mesnih izdelkih z manj maščobami, nižjo vsebnostjo holesterola in ne previsoko vsebnostjo natrijevega klorida (soli) in nitritov. Poleg tega je zaželena izboljšana maščobnokislinska sestava mesa (Zhang in sod., 2010), saj so bili ugodni vplivi VNМК v prehrani ljudi na njihovo zdravje dokazani v številnih epidemioloških in kliničnih študijah (Dal Bosco in sod., 2004). Največji izziv rejcev in mesne industrije je torej ponuditi kupcem mehko, sočno, okusno in lepo obarvano meso z ugodno maščobnokislinsko sestavo. Kunčje meso je poznano po svoji ugodni maščobnokislinski sestavi, ki je v veliki meri posledica njihove prehrane, ki vključuje veliko lucerne.

Maščobnokislinsko sestavo mesa lahko spreminjamo s prehrano živali (predvsem pri neprežvekovalcih). Če jim krmimo krmo, bogato z VNМК povečamo delež VNМК ter vsebnost n-3 maščobnih kislin v mesu, kar ugodno vpliva na zdravje porabnikov, saj zmanjšuje tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja, hipertenzije (visok krvni tlak) in artritisa (Marcinčák in sod., 2005). Povišanje vsebnosti VNМК v mesu je torej s stališča prehranske vrednosti in vpliva na zdravje ljudi zelo dobrodošlo, vendar pa so taki proizvodi bolj podvrženi oksidacijskemu kvarjenju. To je z vidika kakovosti mesa nezaželeno, saj vodi do poslabšanja senzoričnih lastnosti (npr. izgube barve) ter do nastajanja toksičnih produktov (peroksidi, kisline, aldehidi, polimerizacijski produkti). Da oksidacijo preprečimo oziroma povečamo oksidacijsko stabilnost mesa, je potrebna primerna zaščita, ki jo lahko ponudimo z dodatkom različnih antioksidantov v obrok živali. Ti preprečujejo in zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije in s tem zavirajo oksidacijske reakcije, ki prizadenejo biološko pomembne molekule kot so maščobe, beljakovine in nukleinske kisline.

Zaradi vedno večje ozaveščenosti porabnikov se pojavlja zahteva po uporabi naravnih antioksidantov, ki so jih že stoletja tradicionalno uporabljali za izboljšanje senzoričnih karakteristik ter podaljševanje roka uporabnosti živil. V naši raziskavi smo se odločili preveriti učinke zdravilne gobe svetlikava pološčenka (*Ganoderma lucidum*) imenovane tudi reiši, ki jo pogosto uporabljajo v tradicionalni kitajski medicini, in oljčnih listov, ki za zdaj še vedno v preveliki meri predstavljajo odpadek pri pridelavi oljčnega olja.

Za proučevanje antioksidacijskih lastnosti omenjenih naravnih dodatkov smo izvedli prehranski poskus, v katerem smo z dodatkom lanenega olja živali izpostavili prehranskemu oksidacijskemu stresu. Laneno olje je bogat vir VNМК, saj te predstavljajo dobrih 71 % vseh maščobnih kislin, od tega je kar 55,6 % n-3 VNМК in 15,6 % n-6 VNМК. n-3 VNМК so zaradi velikega števila dvojnih vezi in njihove pozicije zelo podvržene lipidni oksidaciji. Za lažje določanje antioksidacijske učinkovitosti testiranih

naravnih dodatkov smo s 6-% dodatkom lanenega olja v krmo kuncev le-te izpostavili dodatni oksidacijski obremenitvi (stresu). Nasprotno pa smo pri kontrolni skupini uporabili palmovo mast, ki vsebuje 99,5 % nasičenih maščobnih kislin (NMK) in zaradi izredno nizke vsebnost VNMK ne predstavlja nevarnosti za oksidacijo.

Stopnjo oksidacijskega stresa v organizmu živali smo določali z različnimi analitskimi metodami. Lipidno oksidacijo smo merili z določanjem koncentracije MDA v seču, plazmi, jetrih ter hrbtni in stegenski mišici. Oksidacijski stres organizma smo ocenili tudi z merjenjem poškodb DNA mononuklearnih krvnih celic (levkocitov) s kometnim testom. Oksidacijsko stabilnost mesa smo ocenili z merjenjem koncentracij MDA v mesu, obdelanem in shranjenem na različne načine. Antioksidacijski status prebavil smo določali z merjenjem antioksidacijske kapacitete v maščobah in v vodi topnih antioksidantov v tkivu in vsebini tankega črevesa. Z merjenjem višine črevesnih resic in globine intestinalnih žlez pa smo ocenili splošno histološko stanje prebavil.

Zaradi intenzivne reje so domače živali vse bolj izpostavljene različnim stresom, med katere spada tudi prehranski oksidacijski stres. Pri povečanem vnosu maščob, predvsem VNMK, v organizem domačih živali, lahko pride do povečane oksidacije maščob, kar vpliva na zdravstveno stanje živali in povzroča slabšo prirejo oziroma proizvode s slabšo oksidacijsko stabilnostjo. V našem poskusu kunci niso kazali nikakršnih bolezenskih znakov, ki bi lahko bili posledica oksidacijskega stresa. Tekom poskusa smo izločili dve samici, ki zaradi žuljev na nogah nista bili primerni za poskus. Vir maščob ni vplival na prirast živali, saj ni bilo statistično značilnih razlik med telesno maso živali različnih poskusnih skupin. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v izkoriščanju krme. Glede na visoko vsebnost nasičenih maščobnih kislin v krmi z dodano palmovo mastjo smo pri skupini KONT - pričakovali slabši prirast in izkoriščanje krme, ki naj bi bil posledica negativnega razmerja med stopnjo nasičenosti in prebavljivostjo maščob (nasičene maščobe so slabše prebavljive kot nenasičene) (Maertens in sod., 1986), kar so ugotovili tudi Voljč in sod. (2011) pri piščancih. Vendar so podobne rezultate pri kuncih dobili tudi drugi raziskovalci, saj krma obogatena z n-3 VNMK ni značilno vplivala na proizvodne rezultate (Bernardini in sod., 1999; Dal Bosco in sod., 2004; Kouba in sod., 2008; Bianchi in sod., 2009). Nasprotno pa so Bianchi in sod. (2006) ugotovili, da je dodatek 8 % lanenega semena zmanjšal dnevni prirast in tudi končno telesno maso kuncev v primerjavi s skupino, ki ni dobivala dodatka semena. Dodatek gob ali oljčnih listov v naši raziskavi ni vplival na proizvodne rezultate. Podobno so ugotovili tudi Coni in sod. (2000) in Botsoglou in sod. (2010), kjer dodatek oljčnega olja in olevropeina oziroma oljčnih listov ni vplival na proizvodne rezultate pri kuncih oziroma puranih. Nasprotno pa so Paiva-Martins in sod. (2009) z dodatkom 5 oziroma 10 % oljčnih listov v krmo prašičev statistično značilno znižali dnevni prirast in dnevno zauživanje krme ter poslabšali izkoriščanje krme, kar je vodilo v nižjo končno telesno maso prašičev.

5.1.1 Maščobnokislinska sestava in splošni oksidacijski status organizma

Oksidacijski stres ugotavljamo z različnimi metodami. Lahko določamo koncentracijo makromolekul, ki nastanejo pri oksidaciji maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov ali DNA, v krvi ali izločenem seču ali pa merimo direktne poškodbe DNA v posameznih celicah. Eden izmed produktov, ki nastajajo pri oksidacijski razgradnji VNМК, je tudi sekundarni produkt oksidacije n-3 VNМК MDA, ki je za organizem zelo škodljiv, saj je toksičen, kancerogen in mutagen (Marnett, 2002). Določanje koncentracij MDA je ena najpogostejših metod za določanje lipidne oksidacije v bioloških vzorcih (Nielsen in sod., 1997), pri kateri je osnova določitve nastanek intenzivno obarvanega kompleksa med MDA in TBA, ki ga po ločevanju s HPLC zaznamo z uporabo UV VIS ali fluorescenčnega detektorja (Marnett, 1999). Pri procesih lipidne oksidacije lahko nastali prosti radikali povzročajo poškodbe tudi na molekulah DNA. Danes je kometni test uveljavljena metoda za določanje oksidacijskih poškodb molekul DNA. Odlikujejo ga predvsem enostavnost, velika občutljivost, majhna količina vzorca, majhni stroški in hitra izvedba analize (Dhawan in sod., 2009). V naši raziskavi smo stopnjo poškodb določali na levkocitih, celicah, ki krožijo po vsem telesu in s tem dobro odražajo oksidacijski status organizma.

Oksidacijski stres je posledica dolgotrajne izpostavljenosti organizma prooksidantom in hkratnem pomanjkanju antioksidantov. Oksidacijo lahko zmanjšamo, če zagotovimo dovolj antioksidantov, da preprečimo nastanek prostih radikalov. Dejavniki, ki vplivajo na obseg oksidacije so: vsebnost VNМК v membranah, količina nastalih prostih radikalov in nivo antioksidantov, ki so lahko endogenega ali eksogenega izvora (Brenes in sod., 2008). V literaturi obstajajo nekatere raziskave o vplivu prehrane na maščobnokislinsko sestavo in oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa, ki se jim bomo podrobneje posvetili v naslednjem poglavju, ni pa veliko raziskav, plazme in ostalih tkiv, vključenih v metabolizem, kot so npr. jetra (Tres in sod., 2009). V našem poskusu vir maščobe, ki so ga živali dobivale v krmi, ni vplival na vsebnost maščob v tkivih, saj se ta ni značilno razlikovala med skupinami. Vsebnost maščob je bila v stegenski mišici v povprečju 2,7-krat višja kot v hrbtni mišici. V obeh mišicah je bila vsebnost maščob nekoliko nižja pri skupinah, ki smo jima dodajali gobe oziroma oljčne liste. Nasprotno pa je bila vsebnost maščob v maščobnem tkivu pri teh dveh skupinah višja v primerjavi s kontrolnima skupinama, vendar razlike niso bile statistično značilne. Omenili smo, da je stopnja oksidacije odvisna tudi od vsebnosti VNМК. V naši raziskavi je dodatek lanenega olja v povprečju za štirikrat zvišal vsebnost VNМК na račun NMK v mišicah, maščobnem tkivu in jetrih ter v slednjih povzročil tudi znižanje vsebnosti ENМК. V vseh analiziranih tkivih se je ob dodatku lanenega olja statistično značilno ($p < 0,001$) povečala vsebnost α -linolenske kisline in nekaterih drugih n-3 VNМК v primerjavi s palmovo mastjo. Glede na to, da se linolna in α -linolenska kislina shranjujeta v trigliceridih, se ju je pričakovano največ naložilo v maščobnem tkivu. To se je pokazalo tudi pri mišicah, kjer je večji delež omenjenih kislin vsebovala stegenska mišica, ki je imela večjo vsebnost maščob. S povečano vsebnostjo VNМК pri skupinah, ki so s krmo zauživale laneno olje, se je statistično značilno

($p < 0,001$) zožilo razmerje n-6/n-3 VNMK v vseh tkivih. Z ožjim razmerjem n-6/n-3 VNMK tako v mišicah oziroma mesu kuncev kot tudi v maščobnem tkivu in jetrih lahko pridobimo bolj zdravo hrano za ljudi, s katero prispevamo k boljšemu razmerju n-6/n-3 VNMK v prehrani ljudi in s tem k njihovem zdravju. Dodatek v našem poskusu nista imela večjega vpliva na maščobnokislinsko sestavo. Razlike so se pojavile le pri DHA, kjer je dodatek gob statistično značilno povečal ($p < 0,05$) njen delež v primerjavi s skupino KONT - v obeh mišicah, medtem ko je dodatek oljčnih listov vplival le na povečanje DHA v stegenski mišici. Največji delež DHA in tudi ostalih dolgoverižnih maščobnih kislin so vsebovala jetra, kar je bilo pričakovano, saj se dolgoverižne VNMK tam kopičijo za sintezo eikozanoidov. DHA je maščobna kislina, ki znižuje tveganje za razvoj srčno žilnih obolenj z zmanjševanjem gostote krvi in zniževanjem ravni trigliceridov v krvi (Simopoulos, 2009). Delež linolne kisline se je v primerjavi s KONT - skupino statistično značilno povečal le v maščobnem tkivu pri skupini, ki je zauživala dodatek gob. V literaturi nismo našli raziskav o vplivu gobe reiši na maščobnokislinsko sestavo, je pa nekaj raziskav o vplivu oljčnih listov, kjer prav tako niso opazili pomembnega vpliva dodatka oljčnih listov (Paiva-Martins in sod., 2009).

Glede na prej opisane spremembe v maščobnokislinski sestavi tkiv je v naši raziskavi povečanje deleža VNMK povzročilo povečano koncentracijo MDA v jetrih in obeh mišicah, kar so ugotovili tudi v nekaterih drugih raziskavah (Rezar in sod., 2003; Trebušak in sod., 2011; Voljč in sod., 2011). Nasprotno pa v naši raziskavi dodatek lanenega olja ni vplival na koncentracijo MDA v seču in plazmi, niti ni povzročil razlik v stopnji poškodb DNA levkocitov med skupinami. Oksidacijo lipidov oziroma maščobnih kislin lahko preprečimo ali zmanjšamo z uporabo primernih prehranskih strategij, med katerimi je najpogostejša uporaba v maščobah topnega antioksidanta, vitamina E. Vsebnost vitamina E, ki je eden od antioksidantov, že prisotnih v krmi, je bila očitno zadostna za zaščito pred oksidacijskimi poškodbami DNA in oksidacijo v seču in plazmi, ne pa tudi v jetrih in mišicah, kjer niti dodatki (gobe ali oljčni listi) niso znižali koncentracije MDA. Pri skupinah, ki smo jim dodajali laneno olje, se je v vseh tkivih znižala vsebnost α -tokoferola in zvišala vsebnost γ -tokoferola v primerjavi s skupino, ki je v krmi dobivala dodatek palmove masti. Dodatek gob je zvišal vsebnost α -tokoferola v jetrih in γ -tokoferola v plazmi, medtem ko dodatek oljčnih listov ni pomembno vplival na vsebnost vitamina E v tkivih. Vitamin E je najbolj učinkovit v maščobi topen antioksidant, α -tokoferol pa je oblika vitamina E z največjo antioksidacijsko kapaciteto. Prosti radikali hitreje reagirajo z α -tokoferolom kot z nenasičenimi maščobnimi kislinami (Halliwell in Gutteridge, 2000; Bramley in sod., 2000). V naši raziskavi smo pri vseh treh skupinah, ki so zauživale laneno olje, izmerili statistično značilno ($p < 0,001$) višjo koncentracijo MDA v mišicah v primerjavi s KONT - skupino. Podobno je bilo v jetrih, z izjemo skupine OLJKE, kjer se koncentracija MDA ni statistično razlikovala ($p = 0,320$) od KONT - skupine. Tres in sod. (2009) navajajo, da se s povečanim vnosom rastlinskih olj (več kot 30 g/kg krme) poveča občutljivost na oksidacijo v plazmi kuncev, kar se kaže s povečano vsebnostjo lipidnih

hidroperoksidov v plazmi. Ob tem se je povečala tudi koncentracija MDA v kunčjem mesu, ne pa v plazmi, kjer je bila koncentracija pod mejo detekcije. Primerjava koncentracij MDA v našem poskusu z rezultati Tres in sod. (2009) je pokazala, da so naše vrednosti MDA v jetrih in mišicah zelo nizke. Kot smo omenili, je dodatek lanenega olja statistično značilno povečal koncentracijo MDA, ampak verjetno ni povzročil oksidacijskega stresa pri kuncih. Razloge lahko iščemo v dobri oksidacijski stabilnosti krme oziroma lanenega olja, kar smo dokazali v kasnejših raziskavah na z n-3 VNMK obogateni krmi za kokoši nesnice (6 % dodanega lanenega olja). Antioksidanti, naravno prisotni v lanenem olju, nudijo zadostno zaščito pred oksidacijo, kar se je pokazalo tudi v našem poskusu z nizkimi koncentracijami MDA. Pri prašičih in piščancih so ugotovili, da se s povečanim vnosom VNMK poveča koncentracija MDA v plazmi: z dodatkom 5 % lanenega olja v krmo prašičev je koncentracija MDA v plazmi narasla za dvakrat v primerjavi s kontrolno skupino (Rezar in sod., 2003), medtem ko je pri piščancih dodatek 7,5 % lanenega olja povečal koncentracijo MDA za petkrat (Voljč in sod., 2011). Dodatka gob ali oljčnih listov v naši raziskavi nista značilno vplivala na znižanje koncentracij MDA. Xu in sod. (2009) so v *in vitro* raziskavi poročali o visoki antioksidacijski aktivnosti karboksimetiliranega polisaharida C-GLP, izoliranega iz gobe reiši, kot odstranjevalca hidroksi radikalov in hidrogen peroksidov. Od koncentracije odvisno antioksidacijsko aktivnost štirih polisaharidov (GLP-I, GLP-II, GLP-III, GLP-IV) so dokazali tudi Shi in sod. (2013). V raziskavi na ljudeh je zaužitje gobe reiši povzročilo dolgotrajno povečanje antioksidacijske kapacitete v plazmi (Wachtel-Galor in sod., 2004b). Antioksidacijsko učinkovitost peptida iz gobe reiši lahko primerjamo z učinkovitostjo sintetičnega antioksidanta BHT, kar so s svojimi rezultati potrdili Sun in sod. (2004). Nizka pojavnost srčno žilnih bolezni na področju Sredozemlja je pripeljala do večjega zanimanja za proučevanje ugodnih učinkov oljčnega olja in tudi oljčnih listov. Flavonoli, flavan-3-oli in flavoni so fenolne spojine oljčnih listov z najboljšo antioksidacijsko aktivnostjo (Benavente-García in sod., 2000). Al-Azzawie in Alhamdani (2006) sta z dodatkom olevropeina zmanjšala oksidacijski stres in raven sladkorja v krvi pri kuncih. Prav tako so Coni in sod. (2000) zmanjšali oksidacijski stres pri kuncih z dodatkom olevropeina v krmo. Razlike v učinkovitosti bi lahko iskali v obliki naših dodatkov, saj so ostali raziskovalci v večini uporabljali ekstrakte oziroma so izolirali snovi z visokimi antioksidacijskimi lastnostmi.

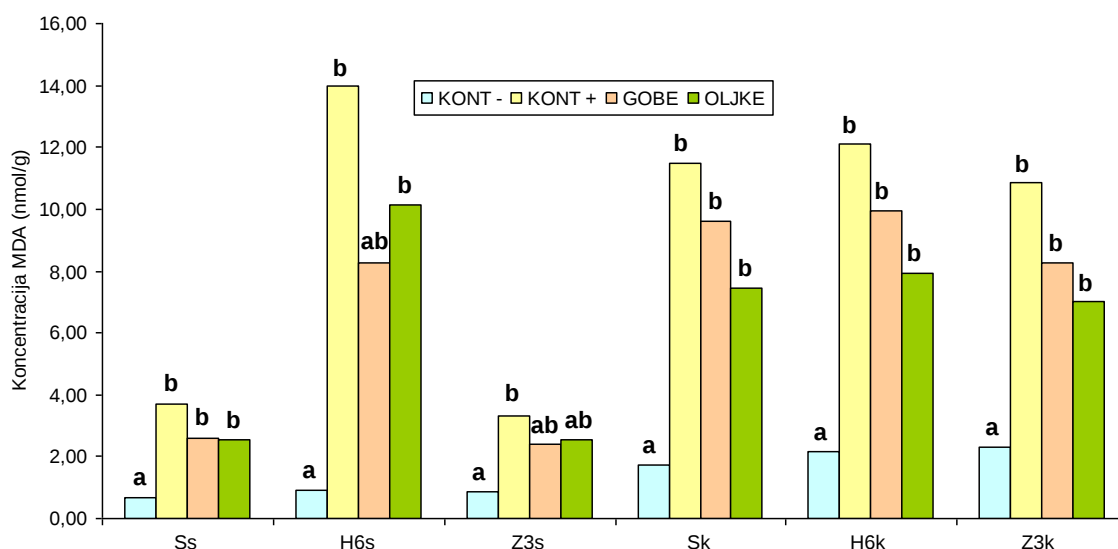
5.1.2 Maščobnokislinska sestava in oksidacijska stabilnost mesa

Meso pogosto povezujemo z negativnimi vplivi na zdravje človeka, zaradi prepričanja o njegovi visoki vsebnosti maščob. Zato pogosto slišimo priporočila o majhnem zauživanju mesa, predvsem rdečega mesa, za zmanjšanje tveganja nastanka raka, debelosti in bolezni srca in ožilja. Kljub temu pa se je potrebno zavedati, da je meso pomemben vir mnogih hranil, kot so železo, selen, vitamini in esencialne aminokisline, ki jih rastlinska živila sploh ne vsebujejo ali pa le v zelo majhnih količinah (Biesalski, 2005). Poleg tega ima meso kot beljakovinsko bogato in z ogljikovimi hidrati revno živilo nizek glikemični

indeks, kar ugodno vpliva na preprečitev razvoja sladkorne bolezni in raka. Tako lahko rečemo, da je meso pomembno živilo za zdravje in razvoj ljudi in pri zmernem zauživanju nima neugodnih učinkov na zdravje (Salobir, 2006). Pozorni pa moramo biti pri uživanju mesnih izdelkov, ki so pogosto bogati z maščobami in imajo zaradi večje vsebnosti nasičenih maščobnih kislin lahko neugoden učinek, predvsem zaradi prekomernega vnosa energije in izpodrivanja živil, bogatih s prehransko vlaknino, vitamini, rudninskimi snovmi in antioksidanti.

Omenili smo, da je maščobnokislinska sestava mesa odvisna tako od biosinteze maščobnih kislin v tkivih kot tudi maščobnokislinske sestave zaužitih maščob, ki je še posebej pomembna pri neprežvekovalcih. Ker kunci dobro prebavijo čiste masti, olja in krmo, bogato z maščobami, lahko z dodatkom rastlinskih olj izboljšamo maščobnokislinsko sestavo kunčjega mesa in vplivamo na sestavo ostalih tkiv. V naši raziskavi smo s 6-% dodatkom z n-3 VNМК bogatega lanenega olja v krmo kuncev dosegli povečanje teh maščobnih kislin v mesu. Predvsem na račun NMK se je povečala vsebnost n-3 VNМК, kar je močno vplivalo tudi na razmerje med n-6 in n-3 VNМК, ki je bilo pri skupinah, ki so zauživale laneno olje, kar štirikrat ožje kot pri kontrolni skupini. V raziskavi, ki so jo opravili Gondret in sod. (1998), so med drugim primerjali vpliv krme z dodatkom 20 g sončničnega (vir VNМК), palmovega (vir nasičenih in enkrat nenasičenih MK) ali kokosovega olja (vir srednje verižnih NMK) na maščobnokislinsko sestavo kunčjega mesa. Vsebnost VNМК je bila pričakovano najvišja pri skupini, ki je zauživala dodatek sončničnega olja in najnižja pri kokosovem olju. Bernardini in sod. (1999) so primerjali vplive različnih virov maščob, ki so se razlikovali v razmerju med n-6 in n-3 VNМК. Ugotovili so, da je dodatek 160 g lanenega semena na kg krme značilno povečal delež α -linolenske kisline in zožil razmerje med n-6 in n-3 VNМК v primerjavi s standardno krmo ali krmo z dodanim ribjim oljem (60 g/kg) v jetrih, mišicah in maščobnem tkivu kuncev. Podobno so ugotovili tudi pri dodatku 30 g ekstrudiranih lanenih semen na kg krme. Taka prehrana je povečala delež α -linolenske kisline v mišicah, maščobi in v surovem in kuhanem mesu kuncev. Prav tako se je povečal delež dolgoverižnih n-3 VNМК v mesu, kar je povzročilo ožje, ugodnejše razmerje med n-6 in n-3 VNМК (Kouba in sod., 2008). Gigaud in Combes (2008) sta primerjala vpliv različnega razmerja med n-6 in n-3 VNМК v krmi kuncev na maščobnokislinsko sestavo njihovega mesa. Razmerje sta spreminjala z dodajanjem različnih deležev lucerne (15 % do 30 %) in različnih virov maščob (palmovo olje, repično olje ali laneno seme). Pričakovano je krma z višjo vsebnostjo n-3 VNМК povišala vsebnost tudi v mesu in znižala razmerje med n-6 in n-3 VNМК. Maertens in sod. (2008) so prav tako proučevali vpliv različnega razmerja med n-6 in n-3 VNМК v krmi v različnih obdobjih pitanja kuncev. Za krmo, obogateno z n-3 VNМК, so uporabili dodatek 12,8 % koncentrata, ki je temeljil na ekstrudiranem lanenem semenu. Ugotovili so, da maščobnokislinsko sestavo lahko uspešno spremenimo že s samo dvotedenskim krmljenjem krme, obogatene z n-3 VNМК.

Z dodajanjem VNМК v prehrano živali smo spremenili maščobnokislinsko sestavo kunčjega mesa, kar je ugodno s prehranskega stališča in neugodno s strani oksidacijske stabilnosti mesa, saj kakovost mesa ni odvisna samo od sestave, ampak tudi od senzoričnih lastnosti mesa. Lipidna oksidacija pri živalih in ljudeh vodi do mnogih zdravju škodljivih produktov ter do zmanjšanja kakovosti mesa in mesnih izdelkov med skladiščenjem (Esterbauer, 1993). Za zaščito kakovosti živil živalskega izvora lahko h končnim proizvodom dodajamo nekatere antioksidante, pri svežih proizvodih, kot je meso, pa lahko boljšo oksidacijsko stabilnost dosežemo le s krmljenjem živali s krmo, obogateno s primerno količino antioksidantov. Dodajanje antioksidantov v krmo je tudi bolj učinkovito, saj se ti naložijo v predele, kjer je njihova aktivnost najbolj potrebna (Govaris in sod., 2004). Zato je pomembno, da poleg izboljšane maščobnokislinske sestave kunčjega mesa z dodatki antioksidantov poskrbimo tudi za njegovo oksidacijsko stabilnost.



^{a, b} skupine, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično razlikujejo pri $p \leq 0,05$

Imena poskusnih skupin so razložena na strani 20

Načini obdelave in shranjevanja vzorcev so razloženi na strani 28

Slika 12: Koncentracija MDA (nmol/g) v vzorcih mesa, obdelanih na različne načine

Figure 12: Concentration of MDA (nmol/g) in meat samples processed using different methods

V naši raziskavi smo z izboljšano maščobnokislinsko sestavo poslabšali oksidacijsko stabilnost mesa hrbtne mišice, kar je prikazano na sliki 12. Koncentracija MDA, ki je pokazatelj lipidne oksidacije, je bila v vseh vzorcih skupin, ki so zauživale laneno olje, večja kot pri kontrolni skupini. Postopki obdelave so prav tako povečali koncentracijo MDA, kar se je pokazalo predvsem pri kuhanih vzorcih in pri tistih surovih vzorcih, ki smo jih hranili v hladilniku. Z dodatkom lanenega olja se je poslabšala oksidacijska stabilnost mesa, dodatek gob ali oljčnih listov pa ni bistveno izboljšal stabilnosti. Na oksidacijsko stabilnost kuhanega mesa dodatka nista vplivala, sta sicer nekoliko znižala vsebnost MDA,

vendar razlike niso bile statistično značilne. Pri surovih vzorcih pa dodatka v svežem mesu nista statistično značilno znižala vsebnosti MDA, medtem ko sta pri skladiščenem mesu imela določen vpliv na oksidacijsko stabilnost in sicer jo je dodatek gob izboljšal v obeh oblikah skladiščenja, dodatek oljčnih listov pa le v mesu, skladiščenem tri mesece v zamrzovalniku.

Bianchi in sod. (2006) navajajo, da je dodatek 35 % lucerne in 200 mg vitamina E na kg krme povečal delež α -linolenske kisline brez negativnega vpliva na oksidacijsko stabilnost mesa. Istočasen dodatek 8 % lanenega semena pa je močno vplival na maščobnokislinsko sestavo mesa, saj je povečal delež VNMK, predvsem α -linolenske kisline, kar je ugodno vplivalo na razmerje med n-6 in n-3 VNMK. Podobno so dokazali tudi v novejši raziskavi o vplivu različnih deležev dodanega lanenega semena na kakovost mesa, kjer se je delež VNMK prav tako zvišal na račun nasičenih maščobnih kislin (Bianchi in sod., 2009). Ugotovili so, da je najprimernejši dodatek 3 % lanenih semen, saj je le ta hkrati zagotovil ugodno maščobnokislinsko sestavo in kakovost mesa. Dal Bosco in sod. (2004) navajajo, da je tudi dodatek 8 % lanenih semen skupaj z 200 mg dodanega vitamina E na kg krme povečal koncentracijo n-3 VNMK in zožil razmerje med n-6 in n-3 VNMK pri kuncih brez negativnega vpliva na oksidacijsko stabilnost mesa. Petracci in sod. (2009) so ugotovili, da lahko dodatek 3–6 % lanenega semena v krmo kuncev uporabimo za povečanje deleža α -linolenske kisline v kunčjem mesu in poleg tega zagotovimo zadovoljivo stabilnost produkta. Dodatek 3 % lanenega olja je imel ugoden učinek na maščobnokislinsko sestavo kunčjega mesa, saj je povzročil zmanjšanje deleža skupnih nasičenih maščobnih kislin in holesterola ter povečal delež n-3 VNMK. S hkratnim dodatkom vitamina E pa je preprečil oksidacijske procese (Bielanski in Kowalska, 2008). Zsédely in sod. (2008) so proučevali vpliv dodatka mešanice sončničnega in lanenega olja v kombinaciji z različnimi koncentracijami vitamina E na maščobnokislinsko sestavo in oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa. Pričakovano je dodatek olj značilno povišal vsebnost VNMK na račun ENMK in NMK ter znižal razmerje med n-6 in n-3 VNMK. Poleg tega je dodatek vitamina E izboljšal oksidacijsko stabilnost v primerjavi s skupinami, ki vitamina E nista zauživali. Paiva-Martins in sod. (2009) so ugotovili, da dodatek 5 oziroma 10 % oljčnih listov v krmo prašičev ugodno vpliva na oksidacijsko stabilnost mesa in hkrati poveča vsebnost α -tokoferola v hrbtni slanini in intramuskularni maščobi, ob večjem dodatku (10 %) pa je neugodno vplival na proizvodne lastnosti. Pri puranih so ugodne učinke oljčnih listov na oksidacijsko stabilnost v hladilniku shranjenega mesa ugotovili že pri 1-% dodatku, ki je pokazal boljše rezultate kot dodatek 150 mg α -tokoferil acetata/kg krme (Botsoglou in sod., 2010). V literaturi nismo našli raziskav o vplivu gobe reiši na oksidacijsko stabilnost mesa.

Poleg ugodne sestave so za porabnika zelo pomembne senzorične lastnosti mesa. Najpomembnejše lastnosti so videz, ki zajema barvo in čvrstost surovega mesa, tekstura, kjer govorimo o mehkobi in sočnosti, ter vonj in okus (Dalle Zotte, 2002). Na kakovost mesa pomembno vpliva tudi njegova pH vrednost (Hulot in Ouhayoun, 1999), ki ima poleg

vpliva na strukturo beljakovin in izcejo tudi vpliv na barvo in mehkobo mesa. Nižja kot je vrednost pH, svetlejšje je meso. Pri kuncih je mišični pH nevtralen, vendar se takoj po zakolu začne hitro zniževati. pH vrednost odloča tudi o mikrobiološkem ravnotežju v mesu, saj ima nizek pH bakteriostatičen vpliv, zaradi česar menimo, da meso s pH vrednostjo, višjo od 6, ni primerno za skladiščenje, zaradi ugodnega vpliva na razvijanje proteolitičnih mikroorganizmov (Dalle Zotte, 2002). V naši raziskavi je dodatek lanenega olja v krmo kuncev statistično značilno znižal pH vrednost mesa v primerjavi s skupino, ki je zauživala palmovo mast. Nasprotno pa dodatek ekstrudiranega lanenega semena (Benatmane in sod., 2011) in dodatek lanenega semena (Cavani in sod., 2003; Bianchi in sod., 2006) ni vplival na pH vrednost mesa. Naši rezultati so pokazali, da je povečana koncentracija n-3 VNMK v mišici znižala pH vrednost mesa 24 ur *post mortem*. Tudi raziskava na piščancih je pokazala, da ob oksidaciji VNMK pride do rahlega znižanja pH vrednosti mesa (Voljč, 2012), ki ga je dodatek antioksidantov izničil. Dodatek gob ali oljčnih listov ni vplival na pH vrednost. Oljčni listi prav tako niso vplivali na pH vrednost mesa pri prašičih (Paiva-Martins in sod., 2009). Na pH vrednost mesa kuncev niso imeli vpliva tudi dodatki ekstrakta kostanjevega lesa (Gai in sod., 2009) ali različnih virov vitamina E (Virág in sod., 2008), vendar pa je večja koncentracija vitamina E (300 mg/kg krme v primerjavi s 150 mg/kg) vplivala na povečanje pH mesa ledij, ne pa tudi mesa stegna (Virág in sod., 2008).

Na barvo mesa pomembno vpliva količina mioglobina, katerega naloga je skladiščenje kisika za aerobne procese v mišičnem tkivu. Poleg mioglobina na barvo mesa lahko vplivata tudi hemoglobin in citokrom C (Mancini in Hunt, 2005). Mioglobin je sestavljen iz beljakovinskega in nebeljakovinskega dela, ki vsebuje atom železa. Koncentracija mioglobina ni enaka v vseh mišicah, pač pa je odvisna od njihove aktivnosti. Prav tako se koncentracija mioglobina v mišicah razlikuje med različnimi živalskimi vrstami. Ko meso pride v stik z zrakom, pride do t.i. oksigenacije mioglobina, pri kateri se kisik veže z železom in nastane oksimioglobin, ki daje mesu izrazito svetlo rdečo barvo (Mancini in Hunt, 2005). Če mioglobin in oksimioglobin oddata elektron, nastane v procesu oksidacije metmioglobin. Ta daje mesu rjavo barvo (Boles in sod., 2005), kar ima lahko negativen vpliv na videz mesa (Jensen in sod., 1998). V splošnem lahko rečemo, da je barva mesa odvisna od količine in kemijskega stanja mioglobina, stopnje oksidacije železovih atomov in stopnje denaturacije globina (Hulot in Ouhayoun, 1999). Kunčje meso spada med eno najbolj zdravih in kakovostnih, vendar med porabniki ne pretirano priljubljenih vrst mesa. Glede na barvo je uvrščeno med belo meso in je na videz najbolj podobno piščančjemu mesu (Maj in sod., 2012). Glede na literaturo (Gondret in sod., 2005; Hernández in sod., 2006; Metzger in sod., 2006) barvo kunčjega mesa večinoma merijo 24 ur *post mortem*, kar pojasni pomanjkanje informacij o spremembi barve kmalu po zakolu. Zamenjava palmove masti z lanenim oljem je v naši raziskavi vplivala na barvo mesa in sicer je bilo meso svetlejšje (L^*) in bolj rumene (b^*) barve, medtem ko laneno olje ni imelo vpliva na izražanje rdečega (a^*) odtenka. Nasprotno pa Bianchi in sod. (2009) in Cavani in sod.

(2003) poročajo, da laneno seme ni pomembno vplivalo na barvo mesa. V našem poskusu dodatek gob ni vplival na svetel odtenek mesa, je pa bilo meso skupine, ki smo ji dodajali oljne liste, temnejše od mesa skupine KONT +. Dodatek gob in oljčnih listov je statistično značilno znižal rumen odtenek v primerjavi s skupino KONT +, kar kaže, da oba dodatka zavirata oksidacijo mioglobina in oksimioglobina v metmioglobin, ki daje mesu rjavo barvo (Boles in sod., 2005). To še enkrat dokazuje, da je oksidacijska stabilnost mesa s povečanim deležem VNМК slabša. Dodajanje antioksidantov v krmo ima ugodne učinke na lastnosti mesa pri različnih vrstah domačih živali. Proučevali so predvsem dodatek vitamina E, ki se je izkazal za učinkovitega pri izboljšanju stabilnosti barve govedine (Mitsumoto in sod., 1993) in jagnjetine (Priolo in Vasta, 2007), medtem ko tega niso dokazali pri piščančjem (Li in sod., 2009; Voljč, 2012) in kunčjem mesu (Castellini in sod., 1998), kar je lahko posledica večje vsebnosti VNМК v mesu neprežvekovalcev, s čimer se poveča tudi potreba po antioksidantih. Podobno so ugotovili tudi pri dodatku kostanjevih taninov v krmo kuncev Liu in sod. (2009). V literaturi nismo zasledili raziskav o vplivu dodatka gobe reiši na barvo mesa. Dodatek ekstrakta oljčnih listov je zmanjšal oksidacijo oksimioglobina v goveji in prašičji mišici (Hayes in sod., 2009), na barvo svinjine pa dodatek oljčnih listov ni vplival (Paiva-Martins in sod., 2009). To je verjetno posledica oblike dodanih oljčnih listov, saj imajo ekstrakti boljše antioksidacijske lastnosti.

5.1.3 Prebavila

V intenzivni reji imajo kunci pogosto prebavne motnje, kar lahko povzroči veliko gospodarsko škodo, ki se kaže s slabšimi proizvodnimi in fiziološkimi kazalci in pogosto tudi s povečano smrtnostjo. Prebavne motnje lahko obvladujemo predvsem s primerno prehrano in tudi z uporabo različnih krmnih dodatkov (Kermauner, 1994). V zadnjem času se je pri prehrani živali povečalo vključevanje VNМК v krmo z namenom proizvodnje funkcionalne hrane za ljudi. Ker so kunci zelo občutljive živali, moramo biti pozorni pri spremembah prehrane, da se izognemo večjemu poginu živali (Kermauner in Žgur, 2003). Načeloma dodatek maščob nima negativnega vpliva na zdravje kuncev, smo pa pri dodatku maščob med drugim omejeni zaradi načina dodajanja (peletirana krma) in visoke kapacitete zauživanja krme. Pozorni moramo biti tudi pri večjem dodatku maščob, saj lahko neprebavljene maščobe v slepem črevesu porušijo mikrobno ravnovesje (Grün, 2002). Kunci so rastlinojede živali, ki se prehranjujejo predvsem s sočno zeleno krmo. Zaradi njihove majhnosti imajo ustrezno hitrejšo presnovo, kar jim omejuje zauživanje nizkoenergijske krme, poleg tega pa so v naravi zelo iskan plen. Prav zato se prebavni trakt kuncev nekoliko razlikuje od ostalih rastlinojedcev, kot so konji in prežvekovalci. Kuncem prebavila tako omogočajo vnos velikih količin krme (veliko energije in beljakovin), ločevanje prebavljivih in lahko fermentabilnih komponent krme ter hitro izločanje počasi fermentabilnih vlakninastih ostankov. Poleg tega pa jim sistem ločevanja produktov fermentacije v slepem črevesu (cekotrofi) omogoča ponovno zauživanje in absorpcijo v tankem črevesu in zmanjšuje potrebo po veliki absorpcijski površini v debelem črevesu. Kljub temu, da kunci hitro izločijo del vlaknin, pa so prav te neprebavljive vlaknine zanje

izredno pomembne, saj je njihovo pomanjkanje najpogostejši vzrok prebavnih motenj pri kuncih (Rees Davies in Rees Davies, 2003).

V našem poskusu krma z visoko vsebnostjo n-3 VNMK ni statistično značilno vplivala na histološko zgradbo tankega in slepega črevesa. Prav tako nista vplivala na prebavila proučevana dodatka. V literaturi nismo našli raziskav, kjer bi se ukvarjali s histološko zgradbo prebavil odraslih kuncev, kar je verjetno posledica dejstva, da je za kunce najbolj kritično obdobje prebavnih težav v času odstavitve in prvih 10–15 dni po odstavitvi (Bivolarski in Vachkova, 2014). Poleg tega pa se anatomski razvoj prebavil pri kuncih zaključi do devetega tedna, z izjemo slepiča, ki raste do 11 tedna starosti (Fortun-Lamothe in Gidenne, 2006). V prvih tednih po rojstvu pri kuncu pride do velikih sprememb v morfološki zgradbi prebavil. Spremeni se oblika resic oziroma razmerje med višino in širino resic. Ob rojstvu dolge in tanke resice s časom postajajo širše in še daljše. Gallois in sod. (2005) so pri kuncih, starih 28 dni, izmerili višino resic dvanajstnika 746 μm , pri starosti 49 dni pa so resice merile že 940 μm . Globina žlez se je v obdobju od drugega do sedmega tedna povečala s 50 μm na 180 μm . Če pogledamo naše rezultate, vidimo, da se je višina resic zniževala proti koncu tankega črevesa, medtem ko so bile žleze najgloblje na koncu tankega črevesa, v vitem črevesu in najplitvejše v teščem črevesu. Resice v našem poskusu so bile daljše, žleze pa nekoliko plitvejše. Prav tako se je tekom tankega črevesa ožilo razmerje med višino resic in globino žlez, ki je pokazatelj prebavne zmogljivosti tankega črevesa. Širše razmerje pomeni višjo stopnjo prebave in absorpcije (Montagne in sod., 2003). Glede na naše rezultate lahko rečemo, da dodatek maščob, gobe reiši in oljčnih listov ne vpliva na histološko zgradbo prebavil, ki je verjetno bolj odvisna od vlaknine in velikosti delcev krme. Desantis in sod. (2011) so ugotovili, da so imeli kunci, ki so zauživali krmo z bolj fino mletimi delci (2 mm), neenakomerno oblikovane in značilno daljše resice v dvanajstniku v primerjavi s kuncem, pri katerih je bila krma bolj grobo mleta (8 mm). Poleg daljših resic so imeli kunci tudi globlje žleze v dvanajstniku, slepem črevesu in kolonu. Prav tako v naši raziskavi med skupinami ni bilo razlik v antioksidacijski kapaciteti v maščobah (ACL) in v vodi topnih antioksidantov v tkivu in v antioksidacijski kapaciteti v vodi topnih antioksidantov v vsebini tankega črevesa. Do razlik je prišlo le pri antioksidacijski kapaciteti v maščobi topnih antioksidantov v vsebini prebavil, ki je bila najvišja pri skupini, ki je s krmo prejela palmovo mast v primerjavi z ostalimi skupinami, vendar je bila razlika statistično značilna le pri skupinah, ki sta zauživali gobe in oljke. Manjša vrednost ACL bi lahko pomenila bolj učinkovito absorpcijo antioksidantov ali večjo porabo antioksidantov za zaščito organizma pred oksidacijskim stresom.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Dodatek n-3 VNМК je izboljšal maščobnokislinsko sestavo, vendar zvišal koncentracijo MDA in poslabšal oksidacijsko stabilnost mesa pri kuncih.
- Dodatek gobe reiši ali oljčnih listov je znižal koncentracijo MDA.
- Dodatek gobe reiši ali oljčnih listov je v določeni meri izboljšal oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa.
- Dodatek n-3 VNМК in gobe reiši ali oljčnih listov ni vplival na histološko zgradbo prebavil.

S 6-% dodatkom lanenega olja v krmo kuncev smo izboljšali maščobnokislinsko sestavo tkiv in kunčjega mesa. Ker laneno olje vsebuje veliko antioksidantov, oksidacijski stres v našem poskusu verjetno ni bil povzročen v zadostni meri. Proučevana dodatka sta sicer pokazala določene antioksidacijske lastnosti, saj sta v določeni meri znižala koncentracijo MDA in nekoliko izboljšala oksidacijsko stabilnost kunčjega mesa. Razloge bi lahko iskali v prenizki količini in/ali obliki dodanih proučevanih dodatkov.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Oksidacijski stres je v zadnjem času postal predmet mnogih raziskav, tako pri ljudeh kot tudi pri živalih, predvsem zaradi velikega vpliva na razvoj bolezenskih stanj. Do oksidacijskega stresa lahko pride zaradi prevelike prooksidacijske obremenitve ali premajhne antioksidacijske zaščite, pri tem ima veliko vlogo tudi prehrana. S hrano lahko zaužijemo snovi, ki oksidacijo povečujejo, npr. VNMK, alkohol, toksini, lahko pa zaužijemo snovi, ki imajo antioksidacijsko delovanje (vitamini A, C, E, karotenoidi, polifenoli). Glavna naloga živalske proizvodnje je zagotoviti visoko proizvodnjo, zdrave živali in kupcem ponuditi kakovostne živalske proizvode po čim bolj ugodni ceni. Ti morajo biti stabilni in primerni za nadaljnjo predelavo. Pri tem je eden glavnih razlogov za neuspeh prav lipidna peroksidacija, ki jo »pospešujemo« z dodajanjem primernih olj in s tem VNMK v krmo živali, da povečamo prehransko vrednost mesa. Takšni izdelki so seveda bolj občutljivi in manj stabilni. Da lipidno peroksidacijo preprečimo, lahko v krmo živali dodajamo različne antioksidante, kar hkrati povečuje tudi koncentracijo antioksidantov v mesu in vpliva na njegovo prehransko vrednost. Ker se je povečalo povpraševanje po naravnih antioksidantih, je prav, da preizkusimo njihovo učinkovitost v praktičnih pogojih reje.

V naši raziskavi smo z dodatkom lanenega olja v krmo kunce izpostavili oksidacijskemu stresu, da smo proučili učinkovitost gobe reiši (*Ganoderma lucidum*) in oljčnih listov pri preprečevanju oksidacije. Proučili smo tudi učinkovitost omenjenih dodatkov pri izboljševanju oksidacijske stabilnosti kunčjega mesa. Ker so kunci živali s pogostimi prebavnimi motnjami, smo proučili tudi vpliv na histološko zgradbo in antioksidacijsko kapaciteto prebavil.

Prehranski poskus smo izvedli na 48 kuncih (24 samic, 24 samcev) slovenske mesne linije SIKa, ki smo jih pri starosti 75 dni individualno naselili v žične kletke. Po petih dneh prilagajanja smo jih razdelili v štiri skupine po 12 živali (6 samic, 6 samcev). Imeli smo dve kontrolni skupini. V negativni kontrolni skupini (KONT -) nismo povzročili oksidacijskega stresa, ker so živali s krmo dobivale 6 % palmove masti, bogate z NMK. Pri ostalih treh skupinah smo s 6 % dodatkom lanenega olja povzročili prehranski oksidacijski stres. Skupina KONT + je predstavljala pozitivno kontrolo in ni dobivala nobenih drugih dodatkov. Krma pri ostalih dveh skupinah je bila obogatena z dodatkom 1 % gobe reiši v obliki pripravka Galimmun® pri skupini GOBE oziroma z dodatkom 1 % posušenih oljčnih listov pri skupini OLJKE. Po koncu poskusnega obdobja, ki je trajalo 22 dni, smo živali električno omamili, izkrvaveli in odvzeli vzorce za analize.

Oksidacijski stres v organizmu kuncev smo ovrednotili z merjenjem poškodb DNA levkocitov in s koncentracijo produktov oksidacije maščob (MDA) v seču, plazmi, jetrih

ter hrbtni in stegenski mišici. Maščobnokislinsko sestavo smo določili v obeh mišicah, maščobnem tkivu in jetrih, vsebnost vitamina E (α - in γ -tokoferol) pa v plazmi, jetrih in obeh mišicah. Oksidacijsko stabilnost mesa smo ovrednotili z merjenjem MDA v svežih in toplotno obdelanih vzorcih mesa shranjenih na različne načine. V mesu smo merili tudi pH vrednost in barvo. Pogledali smo histološko zgradbo tankega in slepega črevesa in z merjenjem antioksidacijske kapacitete v maščobah in v vodi topnih antioksidantov v tkivu in vsebini tankega črevesa določili antioksidacijski status prebavil.

Dodatek lanenega olja v krmo kuncev ni vplival na stopnjo poškodb DNA levkocitov, prav tako ni bilo razlik v koncentraciji MDA v seču in plazmi med skupinami. Dodatki niso vplivali na stopnjo poškodb DNA levkocitov. Razlike so se pojavile v mišicah in jetrih, kjer je dodatek lanenega olja povečal koncentracijo MDA. Dodatek gob ni vplival na zmanjšanje nastanka MDA, je pa dodatek oljčnih listov znižal koncentracijo MDA v jetrih.

Maščobnokislinska sestava krme je neposredno vplivala na maščobnokislinsko sestavo tkiv. Pri skupinah, ki so zauživale laneno olje, se je povečala vsebnost VNMK, predvsem na račun NMK, medtem ko se je vsebnost ENMK znižala le v jetrih. Zaradi večje vsebnosti n-3 VNMK se je pri skupinah z lanenim oljem za več kot trikrat zožilo razmerje n-6/n-3 VNMK. Dodatka nista pomembno vplivala na maščobnokislinsko sestavo tkiv. Z dodatkom lanenega olja se je v tkivih znižala vsebnost α -tokoferola in zvišala vsebnost γ -tokoferola v primerjavi z dodatkom palmove masti. Dodatek gob je zvišal vsebnost α -tokoferola v jetrih in γ -tokoferola v plazmi, medtem ko oljčni listi niso pomembno vplivali na vsebnost vitamina E v tkivih.

Z dodatkom lanenega olja se je poslabšala oksidacijska stabilnost mesa v primerjavi z dodatkom palmove masti. V svežem mesu dodatka nista statistično značilno znižala vsebnosti MDA. Pri surovem skladiščenem mesu sta dodatka imela določen vpliv na oksidacijsko stabilnost in sicer jo je dodatek gob nekoliko izboljšal v obeh oblikah skladiščenja, dodatek oljčnih listov pa le v mesu, skladiščenem tri mesece v zamrzovalniku. Pri kuhanih vzorcih je bilo nastajanje MDA pri skupinah, ki sta dobivali dodatke, nekoliko manjše, vendar ne statistično značilno, tako v svežih kot tudi v skladiščenih vzorcih mesa. Skupine, ki smo jim dodajali laneno olje, so imele nižjo pH vrednost mesa, ki je bilo tudi svetlejše in bolj rumene barve. Dodatki gob in oljčnih listov so statistično značilno znižali rumen odtonek na raven KONT - skupine.

Pri histološki zgradbi tankega in slepega črevesa laneno olje in dodatki niso imeli nobenega vpliva na višino črevesnih resic in/ali globino intestinalnih žlez. Podobno je bilo tudi pri antioksidacijski kapaciteti v maščobah in v vodi topnih antioksidantov v tkivu in vsebini tankega črevesa. Razlike so se pojavile le pri kapaciteti v maščobi topnih antioksidantov v vsebini tankega črevesa, ki je bila najvišja pri KONT - skupini, dodatka gob ali oljčnih listov pa sta jo statistično značilno znižala.

6.2 SUMMARY

Oxidative stress has recently become a subject of numerous studies, because of the great influence on the development of medical conditions, both in humans and animals. Oxidative stress may occur due to excessive prooxidative load or insufficient antioxidative protection. Diet is one of the factors causing oxidative stress and thus oxidative damage to biological structures. Diet can provide prooxidative substances, such as PUFA, alcohol and toxins, as well as antioxidants (vitamin A, C, E, carotenoids, polyphenols). Major task of animal production is to rear healthy animals with high productivity and offer customers high-quality animal product which are stable and appropriate for further processing. The main reason leading to low quality animal products is lipid oxidation, which is promoted by addition of PUFA in animal diet in order to increase nutritional value of meat. Such products tend to be less stable. To prevent lipid oxidation a variety of antioxidants could be added to animal diet, which at the same time also increase the concentration of antioxidants in meat and thus affect its nutritional value. While from the health point of view consumer demands the use of natural antioxidants in food industry, we decided to test the effectiveness of two natural sources of antioxidants for prevention of oxidative stress in rabbits.

The objective of the present study was to evaluate the effect of Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) or olive leaves on oxidative stress in rabbits fed diets fortified with n-3 fatty acids. We also investigated antioxidative potential of aforementioned dietary supplements in respect to oxidative stability of rabbit meat. Since rabbits are known to be prone to digestion problems we examined the impact of diet on histological structure and antioxidative capacity of gastrointestinal tract.

Forty-eight SIKA rabbits were individually housed in wire cages at the age of 75 days. After five days of adaptation they were randomly divided into four homogeneous groups of 12 animals (6 females, 6 males). We had two control groups. In negative control group (KONT -) the nutritional oxidative stress was not induced because the animals received diet with 6% of palm fat high in saturated fatty acid. In other three groups we induced oxidative stress with 6% linseed oil inclusion in diets, which were either unsupplemented (KONT +) or supplemented with 1% of Reishi (GOBE) or 1% of olive leaves (OLJKE). After 22 days of experiment, rabbits were slaughtered and tissue samples were obtained.

Oxidative stress was evaluated by measuring leukocyte DNA damage and malondialdehyde (MDA) concentration in urine, plasma, liver, back muscle and leg muscle. The fatty acid composition was determined in muscles samples, liver and adipose tissues whereas vitamin E (α - and γ -tocopherol) content was measured in plasma, liver and both muscles. Oxidative stability of meat was evaluated by measuring MDA concentration in the fresh and heat-treated samples stored under different conditions. We also measured

pH value and the colour of meat. Histological structure of small intestine and caecum was analysed. Antioxidative capacity of gastrointestinal tract was evaluated by measuring concentration of water and lipid soluble antioxidants in tissues and contents of intestine.

The addition of linseed oil in rabbits' diet did not affect the level of DNA damage in leukocytes. There were no differences in MDA concentration in urine and plasma between groups. Dietary supplements did not influence the oxidative DNA damage of leukocytes. Differences were detected in muscle and liver tissue where the addition of linseed oil increased concentrations of MDA. Addition of mushroom did not reduce the MDA while olive leaves lowered the MDA concentration in liver.

Dietary fatty acid composition was directly reflected in composition of tissue fatty acids. Linseed oil addition improved the fatty acid composition by increasing PUFA proportion and decreasing of SFA in all tissues while MUFA proportion decreased in liver. Due to increased level of n-3 PUFA in linseed oil groups we observed more than threefold reduction of n-6/n-3 PUFA ratio. Dietary supplements did not affect fatty acid composition in tissue. Groups that were supplemented with linseed oil had lower content of α -tocopherol and higher content of γ -tocopherol, compared to the KONT - group. The addition of mushroom increased the α -tocopherol content in liver and γ -tocopherol in plasma. Olive leaves did not influence the content of vitamin E in tissues.

Oxidative stability of meat was decreased by addition of dietary linseed oil compared to palm fat. The addition of Reishi and olive leaves did not decrease MDA concentration in fresh raw samples of meat. However, the impact on oxidative stability of stored raw meat was improved by Reishi under two different storage conditions while olive leaves tend to lower MDA concentrations in meat frozen for a period of 3 months. Cooked samples of raw meat tend to have lower content of MDA but differences were not statistically significant in fresh and stored-cooked samples, respectively. Lower pH-values of meat were measured in linseed oil group which also had lighter and more yellow meat. Both supplements reduced yellowness of meat on the level of KONT - group.

Histological structure of observed tissues was not affected by any dietary supplement. Similarly, the antioxidative capacity of gastrointestinal tract was not influenced by diet. Differences were observed in capacity of the lipid-soluble antioxidants (ACL) in the small intestinal content, which was the highest in KONT - group, and was significantly decreased by addition of Reishi or olive leaves.

7 VIRI

- Abidi S.L., Mounts T.L. 1997. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 782: 25-32
- Al-Azzawie H.F., Alhamdani M.S.S. 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 78: 1371-1377
- Altarejos A., Salido S., Pérez-Bonilla M., Linares-Palomino P.J., van Beek T.A., Nogueras M., Sánchez A. 2005. Preliminary assay on the radical scavenging activity of olive wood extracts. *Fitoterapia*, 76: 348-351
- Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989-1009
- Benatmane F., Kouba M., Youyou A., Mourot J. 2011. Effect of a linseed diet on lipogenesis, fatty acid composition and stearyl-CoA-desaturase in rabbits. *Animal*, 5: 1993-2000
- Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A., Del Rio J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68: 457-462
- Bernardini M., Dal Bosco A., Castellini C. 1999. Effect of dietary n-3/n-6 ratio on fatty acid composition of liver, meat and perirenal fat in rabbits. *Animal Science*, 68: 647-654
- Bianchi M., Petracci M., Cavani C. 2006. Effects of dietary inclusion of dehydrated lucerne and whole linseed on rabbit meat quality. *World Rabbit Science*, 14: 247-258
- Bianchi M., Petracci M., Cavani C. 2009. The influence of linseed on rabbit meat quality. *World Rabbit Science*, 17: 97-107
- Bielanski P., Kowalska D. 2008. Use of linseed oil and antioxidant (vitamin E) in rabbit diets to improve dietetic traits of rabbit meat. V: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 jun. 2008*. Brascia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 1319-1324
- Biesalski H.K. 2005. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70: 509-524
- Bivolarski B.L., Vachkova E.G. 2014. Morphological and functional events associated to weaning in rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98: 9-18

- Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, 13: 265-301
- Boles J.A., Bowman J.G.P., Boss D.L., Surber L.M.M. 2005. Meat color stability affected by barley variety fed in finishing diet to beef steers. *Meat Science*, 70: 633-638
- 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
- Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H. 2000. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 913-938
- Brenes A., Viveros A., Goñi I., Centeno C., Sáyago-Ayerdy S.G., Arija I., Saura-Calixto F. 2008. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry Science*, 87: 307-316
- Calder P.C., Albers R., Antoine J.M., Blum S., Bourdet-Sicard R., Ferns G.A., Folkerts G., Friedmann P.S., Frost G.S., Guarner F., Løvik M., Macfarlane S., Meyer P.D., M'Rabet L., Serafini M., van Eden W., van Loo J., Vas Dias W., Vidry S., Winklhofer-Roob B.M., Zhao J. 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101: S1-S45
- Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J.A., Renard C.M.G.C., Coimbra M.A. 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 21-32
- Castellini C., Dal Bosco A., Bernardini M., Cyril H.W. 1998. Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability of raw and cooked rabbit meat. *Meat Science*, 50: 153-161
- Castillo C., Hernandez J., Bravo A., Lopez-Alonso M., Pereira V., Benedito J.L. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 169: 286-292
- Cavani C., Betti M., Bianchi M., Petracci M. 2003. Effects of the dietary inclusion of vegetable fat and dehydrated alfalfa meal on the technological properties of rabbit meat. *Veterinary Research Communications*, 27: 643-646
- Chen D.H., Shiou W.Y., Wang K.C., Huang S.Y., Shie Y.T., Tsai C.M., Shie J.F., Chen K.D. 1999. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 46: 47-51

- Cherian G., Hayat Z. 2009. Long-term effects of feeding flaxseeds on hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens. *Poultry Science*, 88: 2555-2561
- Cheung L.M., Cheung P.C.K. 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89: 403-409
- Cheung L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81: 249-255
- Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in Enzymology*, 233: 314-318
- Chow C.K. 2000. Biological effects of oxidized fatty acids. V: Fatty acids in foods and their health implications. Chow C.K. (ed.). New York, Marcel Dekker: 678-709
- Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale M., Masella R., Modesti D., Mattei R., Carlini E.A. 2000. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35: 45-54
- Connor W.E. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 171S-175S
- Cortinas L., Barroeta A., 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
- Dal Bosco A., Castellini C., Bianchi L., Mugnai C. 2004. Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Science*, 66: 407-413
- Dalle Zotte A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*, 75: 11-32
- Dalle Zotte A., Szendrő Z. 2011. The role of rabbit meat as functional food. *Meat Science*, 88: 319-331
- De la Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., López-Sabater M.C. 2005. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4331-4340
- De Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Lekeux P., 2005. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*, 169: 65-74

- Desantis S., Zizza S., Accogli G., Tufarelli V., Laudadio V. 2011. Morphometric features and glycoconjugate pattern of rabbit intestine are affected by particle size of pelleted diets. *The Anatomical Record*, 294: 1875-1889
- Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 5-32
- El S.N., Karakaya S. 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67: 632-638
- Esterbauer H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 779S-786S
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879
- Fellenberg M.A., Speisky H. 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal*, 62: 53-70
- Fennema O.R. 1997. Food chemistry. New York, Marcel Dekker: 906-907
- Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100: 1511-1516
- Fink-Gremmels J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21: 115-120
- Fortun-Lamothe L., Gidenne T. 2006. Recent advances in digestive physiology of growing rabbit. V: Recent advances in rabbit sciences. Maertens L., Coudert P. (eds.). Melle, ILVO: 201-210
- Frankič T., Pajk T., Rezar V., Levart A., Salobir J. 2006. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1838-1844
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj – 16. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8-9 nov. 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 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

- Froufe H.J.C., Abreu R.M.V., Ferreira I.C.F.R. 2009. A QCAR model for predicting antioxidant activity of wild mushrooms. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 20: 579-590
- 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
- Gai F., Gasco L., Liu H.W., Lussiana C., Brugiapaglia A., Masoero G., Zoccarato I. 2009. Effect of diet chestnut tannin supplementation on meat quality, fatty acid profile and lipid stability in broiler rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 8: 787-789
- Galaris D., Mantzaris M., Amorgianiotis C. 2008. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *Hormones*, 7: 114-122
- Gallois M., Gidenne T., Fortun-Lamothe L., Le Huerou-Luron I., Lallès J.P. 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Reproduction, Nutrition, Development*, 45: 109-122
- Gao J., Lin H., Wang X.J., Song Z.G., Jiao H.C. 2010. Vitamin E supplementation alleviates the oxidative stress induced by dexamethasone treatment and improves meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, 89: 318-327
- Gigaud V., Combes S. 2008. The effect of decreasing the omega 6/omega 3 ratio in feed on fatty acid content of rabbit meat to meet human dietary recommendations. V: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 jun. 2008*. Brascia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 1353-1358
- Golob T., Stibilj V., Žlender B., Doberšek U., Jamnik M., Polak T., Salobir J., Čandek Potokar M. 2006. Slovenske prehranske tabele – Meso in mesni izdelki. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 322 str.
- Gondret F., Mourot J., Lebas F., Bonneau M. 1998. Effects of dietary fatty acids on lipogenesis and lipid traits in muscle, adipose tissue and liver of growing rabbits. *Animal Science*, 66: 483-489
- Gondret F., Larzul C., Combes S., de Rochambeau H. 2005. Carcass composition, bone mechanical properties, and meat quality traits in relation to growth rate in rabbits. *Journal of Animal Science*, 83: 1526-1535
- Govaris A., Botsoglou N., Papageorgiou G., Botsoglou E., Ambrosiadis I. 2004. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or α -tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55: 115-123

- Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 279-290
- Grün P. 2002. Reja kuncev. Ljubljana, Kmečki glas: 134 str.
- Guo F.C., Kwakkel R.P., Williams B.A., Parmentier H.K., Li W.K., Yang Z.Q., Verstegen M.W.A. 2004. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella*-infected chickens. *Poultry Science*, 83: 1124-1132
- 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
- Halliwel B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33-50
- Halliwel B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. New York, Oxford University Press: 936 str.
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic: 382-426
- Hayes J.E., Stepanyan V., Allen P., O'Grady M.N., O'Brien N.M., Kerry J.P. 2009. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Science*, 83: 201-208
- Hearst R., Nelson D., McCollum G., Millar B.C., Maeda Y., Goldsmith C.E., Rooney P.J., Loughrey A., Rao J.R., Moore J.E. 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15: 5-7
- Hernández P., Ariño B., Grimal A., Blasco A. 2006. Comparison of carcass and meat characteristics of three rabbit lines selected for litter size or growth rate. *Meat Science*, 73: 645-650
- Hirasawa M., Shouji N., Neta T., Fukushima K., Takada K. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 151-157

- Hulot F., Ouhayoun J. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 7: 15-36
- 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
- Jensen C., Lauridsen C., Bertelsen G. 1998. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 62-72
- Ješe Janežič V. 2001. Koncentracija malondialdehida v krvni plazmi in seču kot indikator peroksidacije lipidov v prehranskih raziskavah. Magistrsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Johnson E., Førland D.T., Sætre L., Bernardshaw S.V., Lyberg T., Hetland G. 2009. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood *ex vivo* and *in vivo*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69: 242-250
- Johnstone A., Thorpe R. 1990. *Immunochemistry in practice*. 2nd edition. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 306 str.
- Kao C.H.J., Jesuthasan A.C., Bishop K.S., Glucina M.P., Ferguson L.R. 2013. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*; 3: 48-65
- Kermauner A. 1994. Fiziologija prebave kuncev. *Sodobno kmetijstvo*, 27: 358-366
- Kermauner A., Žgur S. 2003. Prehrana in klavna kakovost kuncev. V: Zbornik predavanj 12. posvetovanja o prehrani domačih živali "Zdravčevi-Erjavčevi dnevi", Radenci, 6-7 nov. 2003. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 193-204
- Khatua S., Paul S., Acharya K. 2013. Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6: 496-505
- Kim H.W., Kim B.K. 1999. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 121-138
- Kim M.Y., Seguin P., Ahn J.K., Kim J.J., Chun S.C., Kim E.H., Seo S.H., Kang E.Y., Kim S.L., Park Y.J., Ro H.M., Chung I.M. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7265-7270

- 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
- Kouba M., Benatmane F., Blochet J.E., Mourot J. 2008. Effect of a linseed diet on lipid oxidation, fatty acid composition of muscle, perirenal fat, and raw and cooked rabbit meat. *Meat Science*, 80: 829-834
- Kouba M., Mourot J. 2011. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*, 93: 13-17
- Kubo A., Lunde C.S., Kubo I. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1629-1633
- Langseth L. 2000. Antioxidants and their effect on health. V: *Essentials of functional foods*. Schmidl M.K., Labuza T.P. (eds.). Gaithersburg, Aspen Publishers: 303-317
- 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 membranal fractions and on susceptibility to lipid peroxidation. *Meat Science*, 46: 9-22
- Lee J.M., Kwon H., Jeong H., Lee J.W., Lee S.Y., Baek S.J., Surh Y.J. 2001. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research*, 15: 245-249
- Leskanich C.O., Noble R.C. 1997. Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *World's Poultry Science Journal*, 53: 155-183
- Li W.J., Zhao G.P., Chen J.L., 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: 188-198
- Lin K.I., Kao Y.Y., Kuo H.K., Yang W.B., Chou A., Lin H.H., Yu A.L., Wong C.H. 2006. Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 24111-24123
- Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W.D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-299

- Liu H.W., Gai F., Gasco L., Brugiapaglia A., Lussiana C., Guo K.J., Tong J.M., Zoccarato I. 2009. Effects of chestnut tannins on carcass characteristics, meat quality, lipid oxidation and fatty acid composition of rabbits. *Meat Science*, 83: 678-683
- Lu H., Kyo E., Uesaka T., Katoh O., Watanabe H. 2003. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxymethane-induction of colon cancers in male F344 rats. *Oncology Reports*, 10: 375-379
- Lu H., Uesaka T., Katoh O., Kyo E., Watanabe H. 2001. Prevention of the development of preneoplastic lesions, aberrant crypt foci, by a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in male F344 rats. *Oncology Reports*, 8: 1341-1345
- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173: 502-511
- Maertens L. 1998. Fats in rabbit nutrition: A review. *World Rabbit Science*, 6: 341-348
- Maertens L., Huyghebaert G., De Groote G. 1986. Digestibility and digestible energy content of various fats for growing rabbits. *Cuni-Sciences*, 3: 7-14
- Maertens L., Huyghebaert G., Delezie E. 2008. Fatty acid composition of rabbit meat when fed a linseed based diet during different periods after weaning. V: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 jun. 2008. Brascia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 1381-1386
- Maj D., Bieniek J., Sternstein I., Węglarz A., Zapletal P. 2012. Effect of genotype and sex on meat colour changes in rabbit. *Archiv für Tierzucht*, 55: 385-390
- Mancini R.A., Hunt M.C. 2005. Current research in meat color. *Meat Science*, 71: 100-121
- Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montedoro G., Zappia V. 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 159-165
- Marcinčák S., Popelka P., Bystrický P., Hussein K., Hudecová K. 2005. Oxidative stability of meat and meat products after feeding of broiler chickens with additional amounts of vitamin E and rosemary. *Meso*, 7: 34-39
- Marnett L.J. 1999. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424: 83-95
- Marnett L.J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182: 219-222

- Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34: 521-526
- McLean J.A., Karadas F., Surai P.F., McDevitt R.M., Speake B.K. 2005. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 141: 366-372
- Metzger S., Odermatt M., Szendrő Z., Mohaupt M., Romvári R., Makai A., Biró-Németh E., Radnai I., Sipos L. 2006. Comparison of carcass traits and meat quality of Hyplus hybrid, purebred Pannon White rabbits and their crossbreds. *Archiv für Tierzucht*, 49: 389-399
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. 1990. Transition metals as catalysts of »autoxidation« reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8: 95-108
- Mitsumoto M., Arnold R.N., Schaefer D.M., Cassens R.G. 1993. Dietary versus postmortem supplementation of vitamin E on pigment and lipid stability in ground beef. *Journal of Animal Science*, 71: 1812-1816
- Molina Alcaide E., Nefzaoui A. 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38: 227-235
- Montagne L., Pluske J.R., Hampson D.J. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108: 95-117
- Mourot J., Hermier D. 2001. Lipids in monogastric animal meat. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41: 109-118
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43: 1209-1214
- Olive P.L., Wlodek D., Durand R.E., Banáth J.P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198: 259-267
- Paiva-Martins F., Barbosa S., Pinheiro V., Mourão J.L., Outor-Monteiro D. 2009. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat Science*, 82: 438-443

- Papas A.M. 1999. Determination of antioxidative status in humans. V: Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Papas A.M. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 21-36
- 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
- Paterson R.R.M. 2006. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001
- Petracci M., Bianchi M., Cavani C. 2009. Development of rabbit meat products fortified with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Nutrients*, 1: 111-118
- Priolo A., Vasta V. 2007. Effects of tannin-containing diets on small ruminant meat quality. *Italian Journal of Animal Science*, 6: 527-530
- Raes K., De Smet S., Demeyer D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 113: 199-221
- Rees Davies R., Rees Davies J.A.E. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 6: 139-153
- Rezar V., Pajk T., Marinšek Logar R., Ješe Janežič V., Salobir K., Orešnik A., Salobir J. 2003. Wheat bran and oat bran effectively reduce oxidative stress induced by high-fat diets in pigs. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 47: 78-84
- Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F.F., Cimato A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 964-967
- Ross M.H., Romrell L.J., Kaye G.I. 1995. *Histology. A text and atlas*. 3rd edition. Baltimore, Williams & Wilkins: 823 str.
- Rupérez F.J., Martín D., Herrera E., Barbas C. 2001. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935: 45-69
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176
- Sahin K., Sahin N., Onderci M., Gursu M.F., Issi M. 2003. Vitamin C and E can alleviate negative effects of heat stress in Japanese quails. *Food, Agriculture & Environment*, 1: 244-249

- Salobir J. 2006. Uživanje mesa – pomen in priporočila. V: Zbornik predavanj 15. posvetovanja o prehrani domačih živali »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 9-10 nov. 2006. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 1-16
- Salobir J., Rezar V., Pajk T., Levart A. 2005. Effect of nucleotide supplementation on lymphocyte DNA damage induced by dietary oxidative stress in pigs. *Animal Science*, 81: 135-140
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih – vpliv na zdravje. V: Antioksidanti v živilstvu. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Prasad G.B., Bisen P.S. 2009. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10: 717-742
- SAS Inst. Inc. 2008. The SAS System for Windows, Release 9.2. Cary, NC
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 276-282
- 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. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 567-579
- Servili M., Montedoro G. 2002. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 602-613
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G., Morozzi G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054: 113-127
- Shi M., Zhang Z., Yang Y. 2013. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*, 95: 200-206
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295
- Simopoulos A.P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 365-379

- Simopoulos A.P. 2009. Evolutionary aspects of the dietary omega-3:omega -6 fatty acid ratio: medical implications. V: A balanced omega-6/omega-3 fatty acid ratio, cholesterol and coronary heart disease. World review of nutrition and dietetics. Vol. 100. Simopoulos A.P., De Meester F. (eds.). Basel, Karger: 1-21
- 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: 184-91
- Sklan D. 2004. Early gut development: the interaction between feed, gut health and immunity. V: *Interfacing Immunity, Gut Health and Performance*. Tucker L.A., Taylor-Pickard J.A. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 9-31
- Skvarča M. 2000. Zdravstveni vidiki razgradnje maščob med skladiščenjem in pripravo mesa. V: *Meso in mesnine za kakovostno prehrano*, Portorož, 10-11. feb. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 137-151
- Smina T.P., Mathew J., Janardhanan K.K., Devasagayam T.P.A. 2011a. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 438-446
- Smina T.P., De S., Devasagayam T.P.A., Adhikari S., Janardhanan K.K. 2011b. *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research*, 726: 188-194
- Soni M.G., Burdock G.A., Christian M.S., Bitler C.M., Crea R. 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 903-915
- 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.
- Sun J., He H., Xie B.J. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6646-6652
- Surai P.F. 2002a. Antioxidant protection in the intestine: a good beginning is half the battle. V: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, Proceedings of Altech's 18th Annual Symposium. Lyons T.P., Jacques K.A. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 301-322

- Surai P.F. 2002b. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham, Nottingham University Press: 615 str.
- Tan H.W., Tuck K.L., Stupans I., Hayball P.J. 2003. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 785: 187-191
- Trebušak T., Levart A., Voljč M., Tomažin U., Pirman T. 2011. The effect of linseed oil supplementation on performance, fatty acid composition and oxidative status of rabbits. *Acta Agriculturae Slovenica*, 98: 119-125
- Tres A., Bou R., Codony R., Guardiola F. 2009. Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and α -tocopheryl acetate: effects on fatty acid composition and stability of rabbit plasma, liver and meat. *Animal*, 3: 1408-1419
- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M. 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18: 98-112
- Valenzuela B.A. 2002. Natural antioxidants: from body safety to health benefits. V: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Altech's 18th Annual Symposium*, Lyons T.P., Jacques K.A. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 323-332
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84
- 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
- Virág G.Y., Eiben C.S., Tóth T., Schmidt J. 2008. Colour and pH of rabbit meat and fat deposits as affected by the source and dose of dietary vitamin E supplementation. V: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, 10-13 jun. 2008. Brascia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 1467-1471
- Visioli F., Poli A., Galli C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22: 65-75
- Voljč M. 2012. Vpliv kostanjevega tanina, *RRR*- α - in *all-rac*- α -tokoferola na zmanjšanje oksidacijskega stresa piščancev in izboljšanje oksidacijske stabilnosti njihovega mesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 86 str.

- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemec 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
- Wachtel-Galor S., Tomlinson B., Benzie I.F.F. 2004a. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British Journal of Nutrition*, 91: 263-269
- Wachtel-Galor S., Szeto Y.T., Tomlinson B., Benzie I.F.F. 2004b. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55: 75-83
- Wasser S.P. 2005. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). V: *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Coates P.M., Blackman M.R., Cragg G.M., Levine M., Moss J., White J.D. (eds.). New York, Marcel Dekker: 603-622
- WHO (World Health Organization). 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, WHO Technical Report Series, 916: 38 str.
- Wong S.H.Y., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach C.N., Sunderman F.W. 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
- Xiccato G. 1999. Feeding and meat quality in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 7: 75-86
- Xu J., Liu W., Yao W., Pang X., Yin D., Gao X. 2009. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 78: 227-234
- Yu B., Chiou P.W.S. 1997. The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits. *Laboratory Animals*, 31: 254-263
- Yue Q.X., Song X.Y., Ma C., Feng L.X., Guan S.H., Wu W.Y., Yang M., Jiang B.H., Liu X., Cui Y.J., Guo D.A. 2010. Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17: 606-613

- Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E.J., Ahn D.U. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86: 15-31
- 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
- Zhou X., Lin J., Yin Y., Zhao J., Sun X., Tang K. 2007. *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35: 559-574
- Zsédely E., Tóth T., Eiben C.S., Virág G.Y., Fábián J., Schmidt J. 2008. Effect of dietary vegetable oil (sunflower, linseed) and vitamin E supplementation on the fatty acid composition, oxidative stability and quality of rabbit meat. V: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 jun. 2008*. Brascia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 1473-1478

ZAHVALA

V času podiplomskega študija sem spoznala veliko ljudi, ki so mi tako ali drugače pomagali pri nastajanju doktorske disertacije. Prav je, da se ob zaključku najprej zahvalim svoji mentorici doc. dr. Tatjani Pirman, ki me je vzela pod svoje okrilje. Hvala ti za vso strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in podporo pri delu, ki sem jih bila deležna tekom nastajanja tega dela. Čeprav je bilo za obe prvič, mislim, da sva bili kar uspešni.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Janezu Salobirju za pregled in oceno naloge. Si šef, ki si ga v prihodnje lahko le želim. Tvojo strokovnost, prijaznost in sproščenost bo težko nadomestiti.

Hvala tudi prof. dr. Milki Vrecl za strokovni pregled in oceno naloge. Zahvaljujem se vam tudi za vso pomoč in nasvete pri histoloških meritvah.

Hvala dr. Nataši Siard za pregled in pomoč pri oblikovanju naloge.

Hvala tudi prof. dr. Gregorju Fazarincu in ge. Jasni Šporar z Inštituta za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarske fakultete za pomoč pri zbiranju vzorcev prebavil in pripravi histoloških rezin.

Seveda ne smem pozabiti na svoje sodelavce s Katedre za prehrano. Vsem in vsakemu posebej se zahvaljujem za vso pomoč, spodbudo in nasvete, ki sem jih dobila.

Hvala Petru in Igorju za pomoč pri izvedbi poskusa. Hvala tudi Marku, Anici in Mojci za pomoč pri pripravi vzorcev in analizah. Nadi bi se zahvalila za vso pomoč pri urejanju papirjev, Andreju pa za gorske podvige in varne spuste. Hvala Ajdi za vse nasvete, strokovno literaturo in končni pregled naloge. Hvala tudi mojim bivšim »sotrpinkam« Tamari, Mojci in Urški. Brez vas, vaše pomoči in nasvetov, bi mi bilo veliko težje. Zahvaljujem se tudi Vidi za vse posredovane izkušnje in nasvete. Hvala ti za odgovore na vsa moja pomembna in nepomembna vprašanja.

Posebej pa se moram zahvaliti moji »cimri« Alenki. V letih sobivanja sva predelali kar nekaj znanstvenih, strokovnih, manj strokovnih predvsem pa veliko življenjskih tem. Hvala ti za čudovita leta, prijateljstvo in seveda vso pomoč.

Zahvalila bi se tudi moji družini, mami Martini, sestri Darji in nečakinjama, Ajši in Ajdi. Čeprav me je ravno rodiško življenje odpeljalo od doma, vem, da ste mi in mi še vedno stojite ob strani. Hvala tudi Marku in Mariji Simončič za vso pomoč.

Nazadnje pa bi se rada zahvalila še mojima najdražjima. Matjaž, hvala ti za vso pomoč, potrpežljivost, nasvete, spodbudo in odneseno delo. Jerneja pa ... če sem diplomsko delo posvetila mami v zahvalo, naj bo to delo tebi v spodbudo.