

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Primož OGOREVC

**VPLIV DODATKA SELENA, VITAMINOV E IN C TER
RASTLINSKIH POLIFENOLOV NA OKSIDATIVNI STATUS
PITOVNIIH PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH SELENIUM,
VITAMINS E, C AND POLYPHENOLS ON OXIDATIVE STATUS OF
BROILERS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

S tem diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva – zootehniko. Delo je bilo opravljeno na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poskus je bil opravljen na Kmetijski fakulteti v Novem Sadu.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Vido Rezar in za somentorico asist. dr. Alenko Levart.

Recenzent: prof. dr. Janez SALOBIR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Vida REZAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: asist. dr. Alenka LEVART
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Primož OGOREVC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 636.5.084/.087(043.2)=163.6
KG perutnina/pitovni piščanci/prehrana živali/krmni dodatki /selen/vitamin E/vitamin C/tanini/oksidativni status
KK AGRIS L51/6100
AV OGOREVC, Primož
SA REZAR, Vida (mentorica)/LEVART, Alenka (somentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2016
IN VPLIV DODATKA SELENA, VITAMINOV E IN C TER RASTLINSKIH POLIFENOLOV NA OKSIDATIVNI STATUS PITOVNIH PIŠČANCEV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 46 str., 11 pregl., 83 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo preučevali vpliv dodatkov vitaminov E in C, selena, njihove kombinacije in s tanini bogatega ekstrakta lesa sladkega kostanca na proizvodne lastnosti in oksidativni stres pitovnih piščancev. V raziskavo, ki je trajala 40 dni, smo vključili 600 dan starih petelinčkov provenience ross 308. Enaindvajseti dan smo živali razdelili v šest skupin, ki so bile krmljene s krmnimi mešanicami z različnimi dodatki: kontrolna skupina K (brez dodatka), skupina E (200 IU vitamina E/kg), skupina C (250 mg vitamina C/kg), skupina Se (0,20 mg selena/kg), skupina ECSe (200 IU vitamina E/kg, 250 mg vitamina C/kg in 0,20 mg selena/kg) in skupina Fa (500 mg Farmatana BCO/kg). Živali so bile krmljenje po volji. Tedensko smo spremljali maso živali, prirast, zauživanje in izkoriščanje krme. Vpliv dodatkov na oksidativni stres smo ovrednotili z merjenjem koncentracije vitamina E, vitamina C in malondialdehyda (MDA) v krvni plazmi ter antioksidativno kapaciteto v maščobah (ACL) in v vodi (ACW) topnih antioksidantov v krvnem serumu. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da dodatki vitamina E, vitamina C, selena in taninov ne vplivajo na proizvodne lastnosti piščancev. Kombinacija vitaminov E in C ter selena, je zmanjšala zauživanje krme, maso živali in priraste. Dodatek vitamina E in njegova kombinacija z vitaminom C in selenom sta povisala koncentracijo vitamina E in znižala koncentracijo MDA v krvni plazmi. Dodatek vitamina C je statistično značilno povečal vsebnost v maščobah topnih antioksidantov (ACL), medtem ko dodatek selena ali taninov ni vplival na oksidativni status pitovnih piščancev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 636.5.084/.087(043.2)=163.6
CX poultry/broilers/animal nutrition/feed additives/selenium/vitamin E/vitamin C/tannins/oxidative status
CC AGRIS L51/6100
AU OGOREVC, Primož
AA REZAR, Vida (supervisor)/LEVART, Alenka (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2016
TI EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH SELENIUM, VITAMINS E, C AND POLYPHENOLS ON OXIDATIVE STATUS OF BROILERS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 46 p., 11 tab., 83 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In our study effects of dietary supplementation with vitamin E, vitamin C, selenium, their combination and tannins on growth performance and oxidative stress of broilers were investigated. A total of 600, 1-day-old, ross 308 broilers were included in the experiment. On the 21st day of the experiment, broilers were assigned to six groups. The groups were fed ad libitum on basal diet, enriched with 5 % of cold pressed linseed oil to increase oxidative stress and supplemented with: group K (no supplement), group E (200 IU vit E/kg), group C (250 mg vit C/kg), group Se (0,20 mg selenium/kg), group ECSe (200 IU vit E/kg, 250 mg vit C/kg and 0,20 mg selenium/kg) and group Fa (500 mg Farmatan BCO/kg). The experiment lasted 40 days. Body weight, body weight gain, feed intake and feed conversion ratio were recorded weekly. The effect of dietary supplements on oxidative stress was evaluated by measurement of vitamin E, vitamin C and malondialdehyde (MDA) concentration in blood plasma and antioxidative capacity of lipid-soluble (ACL) and water-soluble (ACW) antioxidants in serum. Based on the results we found that supplementation of dietary vitamin E, vitamin C, selenium and tannins, did not influenced growth performance, but combination of vitamin E, vitamin C and selenium lowered feed intake, body weight and weight gain. Supplementation of dietary vitamin E and also his combination with vitamin C and selenium, increased concentration of vitamin E and decreased concentration of MDA in blood plasma. Supplementation of dietary vitamin C significantly increased ACL, while supplementation of selenium or tannins did not affect oxidative status of broilers.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OKSIDATIVNI STRES	3
2.2 METODE ZA MERJENJE OKSIDATIVNEGA STATUSA ORGANIZMA	5
2.2.1 Malondialdehid	5
2.2.2 Antioksidativna kapaciteta	6
2.3 ANTIOKSIDANTI	7
2.3.1 Vitamin E	9
2.3.2 Vitamin C	9
2.3.3 Selen	10
2.3.4 Tanini	11
2.3.5 Sinergistično delovanje antioksidantov	12
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Zasnova poskusa	14
3.1.2 Sestava in hranična vrednost krmnih mešanic	14
3.1.3 Izvedba poskusa	20
3.1.4 Odvzem krvi za analize	20
3.2 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE VITAMINA E	20
3.2.1 Določanje koncentracije vitamina E v vzorcih krme in krvne plazme	21
3.3 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE VITAMINA C	22
3.3.1 Določanje koncentracije vitamina C v vzorcih krme in krvne plazme	22

3.4	ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA	22
3.4.1	Določanje koncentracije malondialdehida (MDA) v vzorcih krme in krvne plazme	23
3.5	ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE	24
3.5.1	Določanje antioksidativne kapacitete v maščobi topnih antioksidantov (ACL) v vzorcih krme	24
3.5.2	Določanje antioksidativne kapacitete v maščobi topnih antioksidantov (ACL) v vzorcih seruma	24
3.5.3	Določanje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov (ACW) v vzorcih krme	24
3.5.4	Določanje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov (ACW) v vzorcih seruma	25
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	26
4	REZULTATI	27
4.1	PROIZVODNE LASTNOSTI PIŠČANCEV	27
4.2	VSEBNOST VITAMINOV V KRVNI PLAZMI	29
4.3	VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA) V KRVNI PLAZMI IN ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA V MAŠČOBAH (ACL) IN V VODI (ACW) TOPNIH ANTIOKSIDANTOV V SERUMU	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.2	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37
7	VIRI	39
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava in izračunane vrednosti energije in hranljivih snovi osnovnih poskusnih krmnih mešanic	15
Preglednica 2: Sestava premiksa	16
Preglednica 3: Kemijske analize poskusnih krmnih mešanic	17
Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava poskusnih krmnih mešanic (g MK/100 g vsote MK)	18
Preglednica 5: Maščobnokislinska sestava (g MK/100 g vsote MK) in vsebnost vitamina E (mg/100g) v lanenem olju	19
Preglednica 6: Telesne mase piščancev (g) od 3. do 6. tedna pitanja ($\bar{X} \pm SD$)	27
Preglednica 7: Povprečni dnevni prirasti (g) piščancev v različnih obdobjih pitanja ($\bar{X} \pm SD$)	28
Preglednica 8: Povprečno dnevno zauživanje krme (g) v različnih obdobjih pitanja ($\bar{X} \pm SD$)	28
Preglednica 9: Izkoriščanje krme piščancev med pitanjem v različnih obdobjih ($\bar{X} \pm SD$)	29
Preglednica 10: Vsebnost vitaminov E in C v krvni plazmi piščancev (LSM \pm standardna napaka)	29
Preglednica 11: Vsebnosti MDA v krvni plazmi ter ACL in ACW v krvnem serumu piščancev (LSM \pm standardna napaka)	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACL	- antioksidativna kapaciteta v vodi topnih antioksidantov
ACW	- antioksidativna kapaciteta v maščobi topnih antioksidantov
BHA	- butilhidroksianizol
BHT	- butilhidroksitoluen
DHK	- dokozahexaenojska kislina
DNK	- deoksiribonukleinska kislina
EPK	- eikozapentaenojska kislina
GC	- plinska kromatografija
HPLC	- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
VLDL	- lipoproteini z zelo majhno gostoto
MDA	- malondialdehid
MK	- maščobne kisline
MPK	- metafosforna kislina
NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMK	- nasičene maščobne kisline
TBARS	- s tiobarbiturno kislino reagirajoče substance
TBK	- tiobarbiturna kislina
TBHQ	- butilhidroksikinon
TCEP	- tris (2-karboksietil) fosfin
TCK	- triklorocetna kislina
TEP	- 1,1,3,3-tetraetoksipropan
VNMK	- večkrat nenasicičene maščobne kisline

1 UVOD

Pri intenzivni reji živali se pogosto srečujemo z negativnimi vplivi oksidativnega stresa, saj so živali nenehno izpostavljeni številnim stresnim dejavnikom, za katere je znano, da vplivajo na produktivnost in počutje živali (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Oksidativni stres pri reji živali je največkrat posledica neprimernih temperatur, raznih bolezenskih stanj in prehrane. Ker so zaželeni veliki prirasti, pride do povečanih energijskih potreb, ki jih zauživanje krme ne more enostavno slediti. Zato živalim v krmo pogosto dodajamo večje količine maščob, predvsem v obliki rastlinskih olj, kot so sončnično, koruzno, palmino, v primeru kreiranja perutninskega mesa obogatenega z n-3 maščobnimi kislinami tudi laneno, repično, sojino. Z dodajanjem rastlinskih olj v krmo pokrijemo povečane energijske potrebe živali, hkrati pa krmo lahko obogatimo z esencialnimi maščobnimi kislinami in v maščobah topnimi vitaminimi (Volč, 2012). Čeprav so rastlinska olja dober vir esencialnih maščobnih kislin, so le-te podvržene oksidaciji. Dodajanje rastlinskih olj v krmo živali zato poveča potrebe po antioksidantih.

Najpogosteje za zmanjševanje negativnih vplivov oksidativnega stresa v organizmu v krmo za živali dodajamo vitamin E, ki je najpomembnejši v maščobah topen antioksidant. Nahaja se v celičnih membranah, kjer preprečuje nastanek verižnih reakcij pri oksidaciji maščobnih kislin ter lovi proste radikale. Prosti radikali namreč hitreje reagirajo z vitaminom E kot z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (Eitenmiller in Lee, 2004). Najbolj razširjena in preučevana izomera vitamina E je α -tokoferol, ki je lahko naravnega (*RRR*- α -tokoferol) ali sintetičnega izvora (*all-rac*- α -tokoferol) (Rudan-Tasič, 2000).

Pogosto v krmo za živali dodajamo tudi vitamin C. Na zraku in svetlobi je zelo neobstojen. Je najpomembnejši v vodi topen antioksidant in v telesu deluje kot reducent. Vitamin C je sposoben reducirati oksidirano obliko vitamina E nazaj v aktivno obliko (Mukai in sod., 2005), poleg tega pa v vodnjem okolju inaktivira kisikove reaktivne spojine (hidroksilne radikale, singletni kisik in superoksidne anionske radikale) (Whitehead in Keller, 2003).

Za izboljšanje oksidativnega statusa živali, bi poleg vitamina E in vitamina C, v krmo lahko dodali tudi selen. Selen je namreč sestavni del encima glutation peroksidaza, za katerega je znano, da ščiti celice pred prostimi radikali. Selen lahko dodajamo v anorganski (običajno natrijev selenit) ali organski (običajno vezan v aminokisline namesto žvepla) oblici. Anorganski selen se v črevesju absorbira kot mineral, organski pa kot aminokislina, tako da se lahko nalaga v tkiva in mišice (Dvorska in Surai, 2006).

Za izboljšanje oksidativnega statusa se v zadnjem času, kot dodatek vse bolj uveljavljajo rastlinski dodatki, še posebej polifenoli. Med polifenole uvrščamo tudi tanine. Delimo jih na kondenzirane, hidrolizirajoče in kompleksne tanine (Aguilera-Carbo in sod., 2008). Tanini se v krmo živali dodajajo predvsem zaradi antimikrobnega delovanja (Mueller-Harvey, 2006), njihova antioksidativna vloga pa je še slabo raziskana.

V raziskavi smo želeli ugotoviti ali:

- dodatki vitaminov E in C, Se, njihove kombinacije ter tanina v krmo za pitovne piščance povečajo vsebnost vitamina E in vitamina C v krvni plazmi,
- dodatki vitaminov E in C, Se, njihove kombinacije ter tanina v krmo za pitovne piščance zmanjša lipidno oksidacijo *in vivo* ter tako povečajo antioksidativno kapaciteto organizma in zmanjšajo tvorbo toksičnih aldehidov, kot je malondialdehid (MDA),
- je dodatek kombinacije vitaminov E in C ter selena pri zmanjšanju oksidativnega stresa bolj učinkovit kot vsak posamezni dodatek.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

V organizmu so prosti radikali (prooksidanti) in antioksidanti v stalnem ravnotežju. Kadar se ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti poruši, govorimo o oksidativnem stresu. Posledica porušenega ravnotežja so oksidativne poškodbe, ki se kažejo v spremembah celičnih makromolekul, celični smrti, ki je posledica apoptoze ali nekroze in v strukturnih poškodbah tkiv (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Prosti radikali so zelo reaktivne in nestabilne oblike atomov, molekul in ionov z vsaj enim neparnim elektronom, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni. So stranski produkti celične presnove in posledica dejavnikov okolja (UV in gama žarki, toplota, kajenje, onesnaženo okolje itd.) ter nekaterih zdravil in snovi kot so aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki itd. (Korošec, 2000).

Proste radikale najpogosteje povezujemo z njihovimi škodljivimi posledicami, vendar organizem proizvaja proste radikale tudi za zaščito pred mikroorganizmi, pomembni pa so tudi pri procesih celičnega signaliziranja in pri regulaciji apoptoze. Sami prosti radikali ne povzročajo težav. Težave nastanejo ob neravnovesju med prostimi radikali in antioksidanti. Antioksidanti namreč pretvorijo proste radikale v stabilne spojine oz. preprečijo njihov nastanek (Frankič in Salobir, 2007).

Posledica delovanja prostih radikalov se pri ljudeh kaže v povečanju dejavnikov tveganja za razvoj različnih bolezni in poškodb tkiv. Korošec (2000) je med te uvrstil bolezni oziroma poškodbe pljuč (emfizem, astma), oči (siva mrena, degeneracija rumene pege), srca in ožilja (ishemija, ateroskleroza), kože (dermatitis, maligni melanom), ledvic (avtoimuna nefroza, kronično odpovedovanje ledvic), mišic (multipla skleroza, mišična distrofija), prebavil (ulkusi, diabetes), osrednjega živčevja (Parkinsonova bolezen, epilepsija), krvi (anemije, malarija) ter druge bolezni kot so revmatoidni artritis, lupus in ishemija.

Negativni vpliv oksidativnega stresa se prav tako kaže pri živalih. Največkrat je povezan z neprimernim okoljem (temperatura, zračenje hleva, gostota naselitve, dostopnost krme in vode) (Sahin in sod., 2001), raznimi bolezenskimi stanji (pljučna hipertenzija, vodenica, kokcidioza) (Georgieva in sod., 2006) ter prehrano (večja vsebnost večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) v obroku, prisotnost toksinov in kovinskih ionov v krmi) (Lauridsen in sod., 1997; Gao in sod., 2010).

Negativni vplivi oksidativnega stresa pri živalih so bili predmet številnih raziskav. Altan in sod. (2003) so pitovne piščance izpostavili visokim temperaturam ($38 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Zanimalo jih je, kako toplotni stres vpliva na lipidno peroksidacijo in oksidativni stres. Vpliv so

merili z vsebnostjo malondialdehida (MDA) v krvni plazmi. Skupina piščancev, ki je bila izpostavljena toplotnemu stresu, je imela večjo vsebnost MDA v plazmi od kontrolne skupine, kar pomeni da je toplotni stres povečal lipidno oksidacijo in oksidativni stres v organizmu.

Znano je, da tudi okužba s kokcidiji poveča oksidativni stres. Koinarski in sod. (2005), so spremljali antioksidativni status piščancev pitancev po okužbi s patogeno bakterijo *Eimeria acervulina*, ki povzroča kokcidiozo. Okuženi piščanci so imeli večjo vsebnost MDA v krvni plazmi ter manjše vsebnosti vitaminov. Okužene živali so bile lažje, so slabše priraščale in slabše izkoriščale krmo.

Tudi dodatek olja, še posebej oksidiranega, negativno vpliva na oksidativni stres, vendar so si rezultati raziskav vpliva oksidiranega olja v krmi, v primerjavi s svežim oljem, na proizvodne rezultate in oksidativni stres pri pitovnih piščancih nasprotujoči. Engberg in sod. (1996), so v krmo piščancev pitancev dodali 11 % oksidiranega rastlinskega olja (9 % repično in 2 % sojino olje). Piščanci, ki so jim v krmo dodali oksidirano rastlinsko olje so imeli slabše proizvodne rezultate, povečano vsebnost MDA in manjše vsebnosti α -tokoferola, β -karotena in luteina v krvni plazmi v primerjavi s piščanci, ki so jim v krmo dodali sveže olje. Tavarez in sod. (2011) so v krmo pitovnih piščancev dodali 4 % oksidirano ali sveže sojino olje. Ugotovili so, da oksidirano sojino olje v krmi, v primerjavi s svežim sojinim oljem, poslabša proizvodne rezultate in zniža vsebnost vitamina E in A v krvni plazmi, vendar pa med živalmi, ki so dobivale s krmo oksidirano ali sveže sojino olje ni bilo razlik v vsebnosti MDA v krvni plazmi. Prav nasprotno Zhang in sod. (2011) med oksidiranimi in svežimi maščobami v krmi (mešanica živalske in rastlinske maščobe) niso ugotovili razlik v proizvodnih rezultatih. Je pa krma z oksidiranimi maščobami povečala oksidacijo maščob v krvni plazmi, ki so jo določili z merjenjem s tiobarbiturno kislino reagirajočimi spojinami (TBARS), in s tem povzročila oksidativni stres. Ugotovili so tudi, da dodajanje antioksidantov v krmo zniža oksidacijo maščob prsnih mišic, kar pomeni, da dodatek antioksidantov v krmo zmanjša oksidativni stres.

Vključevanje večjih količin maščob v krmo je eden glavnih povzročiteljev oksidativnega stresa. V intenzivni rej je zaželen hiter prirast, kar privede do povečanih energijskih potreb živali. Zato v njihovo krmo pogosto vključujemo večje količine maščob, predvsem v obliki rastlinskih olj, ki vsebujejo VNMK. Rastlinska olja (laneno, palmovo, sojino, repično) v krmi živali predstavljajo bogat vir energije, nekatera pa krmo tudi obogatijo z esencialnimi VNMK in v maščobah topnimi vitaminimi (Voljč, 2012). VNMK se učinkoviteje absorbirajo kot nasičene maščobne kisline (NMK), vendar so bolj dovetne za oksidacijo (Lauridsen in sod., 1997).

Esencialnih VNMK organizem ne more sintetizirati, zato jih moramo zagotoviti s hrano. Med esencialne štejemo n-6 in n-3 VNMK. Esencialna VNMK iz skupine n-6 je linolna kislina, iz skupine n-3 pa linolenska. Iz linolne kisline v organizmu nastane arahidonska

kislina, iz linolenske pa eikozapentaenojska (EPK) in dokozaheksanojska kislina (DHK). Nastale VNMK so pomembne sestavine celičnih membran in prekurzorji za sintezo eikozanoidov. Iz n-6 VNMK nastanejo eikozanoidi, ki pospešujejo vnetne procese, iz n-3 VNMK pa eikozanoidi, ki te procese zavirajo. Provenčni eikozanoidi, ki so derivati arahidonske kisline, povečujejo tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni, vnetnih bolezni, debelosti, raka in depresije. EPK in DHK v prehrani delno nadomestita arahidonsko kislino, kot osnovo eikozanoidov v celičnih membranah in s tem omejita nastanek provenčnih eikozanoidov (Wall in sod., 2010). Zato je vključevanje n-3 VNMK v prehrano zelo pomembno, saj s tem pozitivno vplivamo na zdravje. Ker pa so VNMK podvržene oksidaciji, se povečajo potrebe po antioksidantih.

2.2 METODE ZA MERJENJE OKSIDATIVNEGA STATUSA ORGANIZMA

Oksidativni status organizma lahko ugotavljam direktno preko poškodb DNK ali indirektno preko oksidacijskih produktov, z merjenjem koncentracije sekundarnih produktov lipidne peroksidacije, ki je lahko posledica ali vzrok oksidativnega stresa. Najpogosteje se kot pokazatelj lipidne peroksidacije uporablja merjenje koncentracije MDA.

2.2.1 Malondialdehid

Pri lipidni peroksidaciji nastane iz VNMK vrsta produktov, med katerimi so najpogostejši aldehidi. MDA je aldehid, ki največkrat nastane kot posledica oksidacijske razgradnje tistih VNMK, ki imajo več kot dve dvojni vezi. V tkivih sesalcev sta to predvsem arahidonska in DHK kislina (Esterbauer in sod., 1991), v krmi pa linolenska kislina, ki oksidira 10-krat do 15-krat hitreje kot oleinska kislina (Madhavi in sod., 1996). MDA je zelo reaktivna spojina, za katero predvidevajo, da je kancerogena, mutagena, toksična za jetrne celice in da je pobudnik različnih nezaželenih reakcij. Reagira lahko z lipidi in beljakovinami, inaktivira ribonukleaze ter druge encime in se kovalentno veže na nukleinske kisline (Ješe Janežič, 2001).

Koncentracijo MDA lahko določamo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ali s plinsko kromatografijo (GC) (Esterbauer in Cheeseman, 1990). Osnova določanja koncentracije MDA s HPLC je derivatizacija MDA s tiobarbiturno kislino (TBK). Pri tem nastane obarvan kompleks molekule MDA in dveh molekul TBK ($MDA \cdot TBK_2$), ki ga po ločevanju s HPLC zaznamo z uporabo UV VIS detektorja (Chirico, 1994). Za potek reakcije je potrebno kislo okolje ter visoka temperatura. V kislem okolju kompleks MDA z biomolekulami hitro hidrolizira, pri čemer se sprosti MDA, hkrati pa kislo okolje služi kot katalizator za reakcijo MDA s TBK ter zagotavlja ustrezni pH (Bird in Draper, 1984). Za preprečevanje lipidne peroksidacije med pripravo vzorca je potrebno dodati antioksidant butilhidroksitoluen (BHT) (Templar in sod., 1999).

2.2.2 Antioksidativna kapaciteta

Oksidativni status organizma lahko ugotavljamo tudi z merjenjem antioksidativne kapacitete, za kar so v literaturi opisane številne analitske metode (Prior in sod., 2005). Ena od teh je merjenje kemiluminiscence z aparatom Photochem (Analytik Jena, Nemčija).

Določanje antioksidativne kapacitete z aparatom Photochem (Analytik Jena, Nemčija) temelji na zelo hitrem fotokemijskem generiranju superoksidnih anionskih radikalov, z obsevanjem luminola z UV svetlobo (Popov in Lewin, 1996). Nastali superoksidni anionski radikali reagirajo z antioksidanti iz vzorca v posebni pretočni reakcijski celici, kamor prečrpavamo vzorec ter nato z merjenjem kemiluminiscence spremljamo potek kemijske reakcije med presežnimi superoksidnimi anionskimi radikali in luminolom. S kemiluminiscenčnim detektiranjem lahko zaznamo že manj kot nmol antioksidantov. Proizvajalec (Analytik Jena, Nemčija) proizvaja že pripravljene reagenčne komplete za določanje v maščobah topnih (ACL) in v vodi topnih (ACW) antioksidantov.

Določanje antioksidativne kapacitete v maščobah topnih antioksidantov (ACL), temelji na spremeljanju obsega inhibicije kemiluminiscenčnega signala, zaradi antioksidantov v vzorcu (Popov in Lewin, 1996). Obseg inhibicije kemiluminiscenčnega signala je razlika med površino signala pri neinhibirani reakciji, kjer v vzorcu ni antioksidantov in površino signala delno inhibirane reakcije, kjer vzorec vsebuje antioksidante. Aparat Photochem pred merjenjem umerimo s katerimkoli v maščobah topnim antioksidantom.

Določanje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov (ACW), je merjenje zakasnitvenega časa (*lag time*) reakcije (Popov in Lewin, 1999). Antioksidanti iz vzorca na začetku merjenja reagirajo s prostimi radikali in jih nevtralizirajo, kar se kaže z zelo nizkim signalom na detektorju. Ko se antioksidanti v vzorcu porabijo, začnejo presežni radikali reagirati z luminolom. Pri tem se sprošča svetloba. Posledično pride do povečevanja signala na detektorju. Aparat Photochem pred merjenjem umerimo s katerimkoli v vodi topnim antioksidantom.

Prednosti uporabe metode merjenja kemiluminiscence z aparatom Photochem so razmeroma kratek čas merjenja (180 sek. za določitev ACL ter do 120 sek. za določitev ACW), visoka občutljivost, možnost umerjanja aparata z različnimi antioksidanti ter uporaba superoksidnega anionskega radikala, ki je prisoten tudi v telesu. Slabosti uporabe metode merjenja kemiluminiscence z aparatom Photochem so dragi, že pripravljeni reagenti, katerih sestave točno ne poznamo, majhna baza podatkov, saj je metoda relativno nova, prav tako pa še ne poznamo popolnoma mehanizma reakcij (Prior in sod., 2005).

Z omejevanjem dejavnikov, ki povzročajo lipidno peroksidacijo, lahko vplivamo na nastanek njenih produktov, kot so prosti radikali in aldehydi. Posledično s tem zmanjšamo oksidativni stres. Na zmanjšanje oksidativnega stresa lahko vplivamo tudi z zadostnim

vnosom antioksidantov, s čimer lahko povečamo antioksidativno kapaciteto ter izboljšamo zdravstveno stanje živali.

2.3 ANTIOKSIDANTI

Zaradi izpostavljenosti prostim radikalom iz različnih virov, so organizmi razvili vrsto obrambnih mehanizmov. Obrambni mehanizmi pred oksidativnim stresom, ki je posledica prostih radikalov, so popravljalni mehanizmi, preventivni mehanizmi, antioksidativna obramba in fizična obramba (Valko in sod., 2007). Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki že v majhnih količinah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih, kamor sodijo živi organizmi ter hrana oziroma krma (Salobir, 2000).

Antioksidanti zavirajo oksidativne verižne reakcije brez vključevanja vanje, s preprečevanjem in zadrževanjem vstopa nastalih prostih radikalov v oksidativne verižne reakcije. Tako preprečujejo oksidacijo biološko pomembnih molekul v organizmu, ki so tarče prostih radikalov (beljakovine nukleinske kisline in lipidi) (Frankič in Salobir, 2007). Antioksidante v organizmu delimo po izvoru na endogene in eksogene. Endogene antioksidante tvori organizem sam, eksogene pa dobimo s hrano. Vendar pa moramo tudi nekatere esencialne elemente, ki sestavljajo endogene antioksidante dobiti s hrano (Kreft in sod., 2000). Eden takšnih elementov je selen, ki je esencialen za izgradnjo Se-glutation peroksidaze.

Endogene komponente antioksidativnega sistema (Papas, 1999):

- glutation (GSH), Se-glutation peroksidaza,
- Fe-katalaza,
- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH),
- ubikinol-10 (reducirani koencim Q₁₀),
- Mn, Cu, Zn-superoksid dismutaza (SOD),
- sečna kislina,
- lipojska kislina,
- hormoni z antioksidativno aktivnostjo (melatonin, estrogen idr.),
- beljakovine, ki vežejo kovine (albumin ter na albumin vezani tioli in bilirubin, transferin, ceruloplazmin, haptoglobin in hemopeksin).

Prehranski in eksogeni antioksidanti (Papas, 1999):

- tokoferoli in tokotrienoli (vitamin E),
- askorbinska kislina (vitamin C),
- vitamin A in karotenoidi (β -karoten, likopen, lutein idr.),
- Se in drugi kovinski elementi potrebni za delovanje antioksidativnih encimov,
- fitokemijske spojine z antioksidativno aktivnostjo,

- prehranski in drugi dodatki (koencim Q₁₀, glutation, lipojska kislina idr.),
- prehranski antioksidanti (butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), propil galat idr.).

Antioksidante lahko delimo glede na topnost ter na to ali so sintetičnega ali naravnega izvora. V vodi topni antioksidanti so vitamin C, glutation, flavonoidi, sečna kislina idr., v maščobah topni antioksidanti pa so vitamin E, ubikinon (koencim Q₁₀), karotenoidi (β -karoten, likopen) idr. (Korošec, 2000).

Sintetični antioksidanti se zaradi svoje učinkovitosti in nizke cene najpogosteje uporabljajo kot konzervansi. Najpogosteje se uporabljajo sintetični antioksidanti, ki izhajajo iz fenolne strukture, kot so BHA, BHT in terciarni butilhidroksikinon (TBHQ) ter dodecil, propil galat in oktil galat (Fellenberg in Speisky, 2006). Ob sintetičnih antioksidantih je najpogosteje uporabljen antioksidant za preprečevanje lipidne peroksidacije vitamin E. Kot dodatek v krmo se večinoma uporablja sintetična (all-rac-tokoferol) ali semi-sintetična različica (α -tokoferil acetat), ki pa sta po svoji učinkovitosti slabša od naravne oblike α -tokoferola (Frankič in Salobir, 2007).

Med najpomembnejše naravne antioksidante sodijo tokoferoli in askorbinska kislina. Ostale naravne molekule z antioksidativnimi lastnostmi so karoteni (β -karoten, likopen, lutein, astaksantin, zeaksantin in kantaksantin), flavonoidi (catehini, kvercetin, rutin, morin) ter neflavonoidni fenoli (rosmanol in rosmarinidifenol). Naravni antioksidanti so običajno prisotni v delih rastlin (v listih, lubju, semenih in plodovih) (Fellenberg in Speisky, 2006). Dimitrios (2006) kot vir naravnih antioksidantov navaja različno sadje (jagodičevje, češnje, grozdje, slive, jabolka, hruške, kivi, citrone), zelenjavno (jajčevce, artičoke, peteršilj, rabarbaro, cvetačo, fižol, špinačo), zelišča in začimbe (rožmarin, žajbelj, origano, timijan, ingver), črni in zeleni čaj ter ovseno, pšenično in riževo moko.

O oksidativnem stresu govorimo, ko je ravnotežje med oksidanti in antioksidanti porušeno v korist oksidantov in v tem primeru je sposobnost posameznega antioksidanta za zmanjševanje oksidativnega stresa odvisna od njegovih lastnosti. Zato se delovanje različnih antioksidantov v organizmu med seboj razlikuje. Vitamin E je najpomembnejši v maščobah topen antioksidant. Je sestavni del celičnih membran. Membranske lipide ščiti pred napadom prostih radikalov in tako preprečuje lipidno peroksidacijo. V vodi topni antioksidanti (vitamin C, polifenoli, glutation, koencim Q₁₀) pa ščitijo molekule in strukture pred napadom prostih radikalov v vodnem okolju ter sodelujejo pri regeneraciji drugih antioksidantov. Vitamin C, glutation in catehini so namreč sposobni reducirati oksidirane oblike vitamina E nazaj v njegovo aktivno obliko in ga s tem narediti ponovno sposobnega za lovljenje prostih radikalov (Mukai in sod., 2005).

2.3.1 Vitamin E

Vitamin E je skupno ime za kemijsko med seboj podobne spojine, ki so metilni derivati tokola. Med seboj se razlikujejo le po položaju in številu metilnih skupin na benzenovem obroču. Tako ločimo spojine, ki imajo v stranski verigi same nasičene vezi (α -, β -, γ - in δ -tokoferoli), in spojine, ki imajo v stranski verigi tri nenasičene vezi (α -, β -, γ - in δ -tokotrienoli). Vse omenjene spojine so biološko aktivne in imajo antioksidativne lastnosti. Najbolj razširjena in najbolj preučena je izomera α -tokoferola (in zato pogosto kar sinonim za vitamin E). α -tokoferol, ki ga dodajamo kot antioksidant, je lahko naravnega (RRR- α -tokoferol) ali sintetičnega izvora (all-rac- α -tokoferol). Sintetično pridobljeni all-rac- α -tokoferol ima manjšo biološko aktivnost kot naravni RRR- α -tokoferol (Rudan-Tasič, 2000).

α -tokoferol je najpomembnejši v maščobi topen antioksidant. Nahaja se v celičnih membranah. Lovi peroksilne proste radikale in s tem preprečuje nastanek verižnih reakcij pri oksidaciji maščobnih kislin. Prosti radikali namreč hitreje reagirajo z α -tokoferolom kot z VNMK. α -tokoferol odda vodikov proton lipidnim peroksilnim radikalom. Pri tem nastane α -tokoferoksilni radikal, ki je relativno stabilen, nereaktiv in veliko bolj obstojen kot radikali, ki nastanejo pri oksidaciji VNMK (Eitenmiller in Lee, 2004). Nekateri v vodi topni antioksidanti nastali α -tokoferoksilni radikal reducirajo nazaj v njegovo aktivno obliko (Mukai in sod., 2005).

Pozitivne učinke vključevanja vitamina E v krmo pitovnih piščancev so potrdile številne raziskave. Englmaierova in sod. (2011) so preučevali vpliv dodajanja vitamina E (0, 50 ali 100 mg/kg) na koncentracijo vitamina E v tkivih in oksidativno stabilnost mesa. Ugotovili so, da dodatek vitamina E v krmo pitovnih piščancev poveča koncentracijo vitamina E in zniža koncentracijo MDA v stegenski mišici ter s tem izboljša oksidativno stabilnost mesa. Niu in sod. (2009) so pitovne piščance izpostavili toplotnemu stresu (temperatura je nihala med 23,9 °C in 38 °C). Hkrati so piščancem v krmo dodajali vitamin E (0, 100 ali 200 mg/kg). Ugotovili so, da dodatek vitamina E v krmo zmanjša negativne vplive toplotnega stresa. Do podobnih ugotovitev so prišli Sahin in sod. (2001), ko so piščance prav tako izpostavili visoki temperaturi (32 °C) in jim v krmo dodajali različne koncentracije vitamina E (0, 62,5, 125, 250 ali 500 mg/kg). Ugotovili so, da so višje koncentracije dodanega vitamina E v krmo, uspešneje zmanjšujejo negativne vplive toplotnega stresa, ki so ga ovrednotili z merjenjem koncentracije MDA, vitaminov E in A ter nekaterih mineralov v krvni plazmi. Za zmanjševanje negativnih posledic toplotnega stresa priporočajo dodatek 250 mg vitamina E na kilogram krme.

2.3.2 Vitamin C

Vitamin C je najpomembnejši v vodi topen antioksidant. V telesu deluje kot reducent. Njegova reducirana oz. osnovna oblika je askorbinska kislina. Najpomembnejša kemijska lastnost vitamina C je reverzibilni oksidacijsko-reduksijski proces med askorbinsko in

dehidroaskorbinsko kislino (Rudan-Tasič, 2000). Ta redoks sistem je osnova primarne fiziološke aktivnosti vitamina C in je odgovoren za mnoge biokemične reakcije v rastlinskem in živalskem organizmu (Davey in sod., 2000). Antioksidativna lastnost vitamina C je regeneracija oksidiranega vitamina E (Mukai in sod., 2005). Askorbinska kislina α -tokoferoksilnemu radikalu najprej odda en elektron in se oksidira do monodehidroaskorbinske kisline. Ko odda še drugi elektron, se tvori dehidroksiaskorbinska kislina (oksidirana oblika vitamina C), ki pa ni reaktivna in prekine verižno reakcijo lipidne peroksidacije. Dehidroaskorbinska kislina se s pomočjo glutationa, NADP in NADPH ali ubikinona reducira nazaj v osnovno obliko (Jacob, 1995). Druga antioksidativna lastnost vitamina C je, da inaktivira kisikove proste radikale (hidroksil, singletni kisik in superoksid). To kaže na sinergistično delovanje z encimi, ki ščitijo celice, kot so superoksid dismutaza, glutation peroksidaza in katalaza (Whitehead in Keller, 2003).

Veliko raziskav je potrdilo, da dodajanje vitamina C v krmo perutnine zmanjša negativne vplive topotnega stresa. Vathana in sod. (2002) so pri pitovnih piščancih spremljali vpliv dodajanja vitamina C (0, 20 ali 40 mg na piščanca na dan) na proizvodne lastnosti v poletnih mesecih. Dodatek vitamina C je izboljšal proizvodne lastnosti piščancev. Podobne rezultate so dobili Ghazi in sod. (2015). Piščance so izpostavili temperaturi 38 °C in jim v krmo dodajali 200 mg vitamina C na kilogram krme. Poleg izboljšanih proizvodnih lastnosti piščancev, so ugotovili tudi, da je dodatek vitamina C povišal koncentracijo vitamina C v serumu, ni pa vplival na koncentracijo MDA v serumu. Lohakare in sod. (2005) so pitovnim piščancem v običajnih pogojih reje v krmo dodajali različne koncentracije vitamina C (0, 10, 50, 100, 200 ppm). Dodatek vitamina C je izboljšal proizvodne lastnosti, prebavljivost energije, beljakovin in maščob in povišal koncentracijo vitamina C v plazmi in jetrih.

2.3.3 Selen

Selen je esencialni mikroelement. Je sestavni del encima glutation peroksidaze, za katerega je znano, da ščiti celice pred prostimi radikali. V naravi najdemo selen v anorganski obliki in vezanega v organskih spojinah. Selen v anorganski obliki najdemo v različnih mineralih v obliki selenita, selenata in selenida. Selen v "organski obliki" pa je vezan na različne aminokisline, kot sta metionin in cistein (Surai, 2002). V naravi je najpogosteji vir selena v prehrani živali selenometionin (Combs in Combs, 1984). Anorganski in organski selen se razlikujeta v absorpciji in presnovi. Anorganski selen se pasivno absorbira v črevesju kot mineral, uporabljen za takojšnjo sintezo nekaterih selenoproteinov. Preostanek se izloči z blatom in urinom. Organski selen pa se absorbira v črevesju kot aminokislina. Nekaj se ga, podobno kot pri anorganskem, porabi za takojšnjo sintezo selenoproteinov, nekaj pa se ga nespecifično vgradi v novonastale proteine namesto metionina. Tako se nalaga v tkiva in mišice. V prehrani živali je torej glavna prednost na organske spojine vezanega selena

ustvarjanje rezerv selena v telesu, kar je pomembno predvsem pri povišanem oksidativnem stresu (Dvorska in Surai, 2006).

Glede vključevanja selena v prehrano piščancev pitancev je bilo narejenih veliko raziskav. Predvsem so raziskave usmerjene v primerjavo med vplivi anorganskega in na organske spojine vezanega selena. Upton in sod. (2008) so ugotovili, da dodajanje na organske spojine vezanega selena (0,2 mg/kg) v krmo pitovnih piščancev, izboljša nekatere proizvodne lastnosti. Podobne rezultate ob enaki koncentraciji dodatka na organske spojine vezanega selena navajajo Mansoub in sod. (2010). Nasprotno pa Chen in sod. (2014), ob dodatku 0,3 mg na organske spojine vezanega selena na kg krme, pri pitovnih piščancih niso ugotovili statistično značilnih razlik pri proizvodnih lastnostih. Je pa dodatek na organske spojine vezanega selena povečal koncentracijo glutation peroksidaze, superoksid dismutaze, skupno antioksidativno kapaciteto in zmanjšal koncentracijo MDA v krvnem serumu pitovnih piščancev.

2.3.4 Tanini

Tanini so sekundarni metaboliti rastlin, katerih osnovna gradbena enota je fenol. Spadajo med rastlinske polifenole, s srednjo do visoko molekulsko maso (Jansman, 1993). V rastlinah imajo različne fiziološke in kemische lastnosti, prisotni pa so tudi v krmi živali. Vežejo se z beljakovinami in drugimi polimeri, kot so celuloza, hemiceluloza in pektin, da oblikujejo stabilne komplekse (Mangan, 1988). Glede na vsebnost sladkorjev, stopnjo polimerizacije in esterifikacije, tanine v grobem delimo na kondenzirane, hidrolizirajoče in kompleksne tanine (Aguilera-Carbo in sod., 2008).

Kondenzirani tanini so najbolj razširjeni rastlinski tanini. Nimajo ogljikohidratnega jedra kot hidrolizirajoči tanini, ampak se pojavljajo kot vrsta polimerov, kot na primer procianidin (Mangan, 1988). So v glavnem polimerizirani produkti flavan-3-ola in flavan-3,4-diola ali mešanica obeh. Kondenzirani tanini, v katerih prevladujejo flavan-3-oli so tako imenovani katehini, kondenzirani tanini, v katerih prevladujejo flavan-3,4-dioli pa so leukoantocianidini, ker se pri segrevanju v prisotnosti kisline obarvajo in tvorijo antocianidine. Imenujemo jih tudi proantocianidini (Jansman, 1993).

Hidrolizirajoči tanini imajo ogljikohidratno jedro (običajno D-glukoza), katerega hidroksilne skupine so zaestrene s fenolnimi karboksilnimi kislinami, kot so galna, elagna in heksahidroksidifenska kislina. Estri z galno in elagno kislino so galotanini, estri s heksahidroksidifensko kislino pa elagitanini. Hidrolizirajoči tanini razpadajo v prisotnosti kislin, baz ali nekaterih encimov. Ob hidrolizi nastaneta glukoza (ali drugi polihidroksilni alkohol) in galna kislina (ali druge fenolne kisline). Tipičen predstavnik hidrolizirajočih taninov je taninska kislina, ki jo uvrščamo med galotanine (Jansman, 1993).

Kompleksni tanini so snovi, ki nastanejo pri reakciji vezave katehinov ali epikatehinov z galno ali elagno kislino. Reakcijo katalizirajo svetloba, toplota in kisik. Tipičen

predstavnik kompleksnih taninov je katehin galat, ki vsebuje hidrolizirane in kondenzirane tanine (Aguilera-Carbo, 2008).

V prehrano živali se dodaja predvsem hidrolizirajoče tanine, ki jih ekstrahiramo iz trdega lesa kot sta kostanj in hrast. Eden takšnih komercialnih dodatkov je Farmatan (Tanin Sevnica, d.d.). Farmatan je naravni izvleček iz lesa pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.), pridobljen z vodno ekstrakcijo. Vsebuje okrog 75 % hidrolizirajočih taninov, med katerimi prevladujejo elagitanini. Poleg taninov vsebuje še enostavne sladkorje, lignin, celulozo, vezano vodo ter minerale. Med tanini prevladujejo kastalagin in veskalagin, njuna metabolita kastalin in veskalin ter roburini, elagna in galna kislina. Farmatan je v EU notificiran kot senzorični in silirni dodatek, ki se lahko uporablja kot samostojen dodatek ali v kombinaciji z drugimi krmnimi dodatki. Neposredno v krmnih obrokih (v sveži ali konzervirani voluminozni krmi) ali pa v popolnih in dopolnilnih krmnih mešanicah (Voljč, 2012).

Preučevanju vpliva taninov v krmi perutnine je bilo namenjenih veliko raziskav. Tanini lahko zmanjšajo lipidno peroksidacijo z zaviranjem nastanka prostih radikalov (Chung in sod., 1998). Vpliv je odvisen predvsem od količine taninov v krmi. Previsoke vsebnosti tanina v krmi zmanjšajo njeno zauživanje, predvsem zaradi trpkega okusa. Zaradi slabšega zauživanja krme, živali tudi slabše priraščajo (Iji in sod., 2004). Slabši prirast je prav tako lahko posledica zmanjšane absorpcije rudninskih snovi (Hassan in sod., 2003), slabše prebavlјivosti in razpoložljivosti hranil (Voljč, 2012). Tanini se poleg tvorjenja kompleksov z maščobami, ogljikovimi hidrati in beljakovinami vežejo tudi s prebavnimi encimi. Nastanek taninsko encimskih kompleksov vpliva na biološko aktivnost encimov, ter posledično na zmanjšano prebavlјivost hranilnih snovi (Jansman, 1993). Pri manjših koncentracijah tanina v krmi, negativnih učinkov niso opazili. Predvsem zaradi antimikrobnega delovanja in ugodnega vpliva na prebavni trakt, se pogosto uporablja za preprečevanje drisk (Mueller-Harvey, 2006).

2.3.5 Sinergistično delovanje antioksidantov

Znano je, da delovanje v maščobah in v vodi topnih antioksidantov ne poteka samo na individualni ravni. Pomembno je predvsem njihovo sodelovanje in sinergistično delovanje (Niki in sod., 1995). Tako je na primer vitamin C sposoben reducirati oksidirano obliko vitamina E s čemer se poveča njegova antioksidativna sposobnost. Sinergistično delovanje antioksidantov so potrdile tudi nekatere raziskave.

Ipek in sod. (2007) so ugotovili, da dodatek vitamina E skupaj z vitaminom C izboljša proizvodne rezultate prepelic, ki so izpostavljene toplotnemu stresu. Podobne rezultate so dobili Sahin in sod. (2003), ki so ugotovili tudi, da dodajanje kombinacije vitamina E in C v krmo uspešneje zniža vsebnost MDA v serumu, kot dodatek posameznega vitamina. Poleg uspešnejšega znižanja MDA v serumu, pa kombinacija vitamina E in C v krmi,

poveča vsebnost vitamina E in C v serumu (Sahin in sod., 2002). To pomeni, da sinergistično delovanje vitamina E in C uspešneje zmanjšuje škodljive vplive lipidne peroksidacije (Cinar in sod., 2014).

Sinergistično delovanje med vitaminom E in selenom prav tako bolj učinkovito zmanjšuje negativne vplive topotnega stresa, kot posamezni dodatek. Dodajanje vitamina E in na organske spojine vezanega selena v krmo pitovnih piščancev, je izboljšalo encimsko aktivnost glutation peroksidaze (Choct in Naylor, 2004), zvišalo njeno vsebnost v jetrih (Ozkan in sod., 2007) ter povišalo vsebnost superoksid dismutaze in zmanjšalo vsebnost MDA v skeletnih mišicah (Harsini in sod., 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zasnova poskusa

Poskus je bil opravljen na Kmetijski fakulteti v Novem Sadu v okviru bilateralnega sodelovanja. V poskus, ki je trajal 40 dni, smo vključili 600 en dan starih petelinčkov provenience ross 308. Živali smo ves čas trajanja poskusa krmili po volji. Od začetka poskusa do 11. dne smo piščance krmili s krmno mešanico šarter, od 12. do 20. dne z krmno mešanico grover in od 21. dne do konca poskusa s finišerjem. Živali smo 20. dan poskusa razdelili v šest skupin (5 ponovitev znotraj skupine). Krmni mešanici finišer smo glede na skupino dodali različne dodatke, kot sledi:

- K - kontrolna skupina: brez dodatka
- E - skupina z dodatkom vitamina E: 200 IU vitamina E/kg
- C - skupina z dodatkom vitamina C: 250 mg vitamina C/kg
- Se - skupina z dodatkom selena: 0,20 mg selena/kg
- ECSe - skupina z dodatkom vitamina E, vitamina C in selena: 200 IU vitamina E/kg, 250 mg vitamina C/kg in 0,20 mg selena/kg
- Fa - skupina z dodatkom Farmatana BCO: 500 mg Farmatana BCO/kg

3.1.2 Sestava in hranična vrednost krmnih mešanic

Osnovne krmne mešanice šarter, grover in finišer so bile pri vseh skupinah enake (preglednica 1). Vsem skupinam smo v krmno mešanico finišer dodali 5 % hladno stiskanega lanenega olja, ki je bogato z n-3 VNMK, s čimer smo inducirali oksidativni stres.

Preglednica 1: Sestava in izračunane vrednosti energije in hranljivih snovi osnovnih poskusnih krmnih mešanic

	Štarter	Grover	Finišer
Sestava krmnih mešanic			
Koruza (%)	42,13	49,00	53,70
Pšenica (%)	5,00	3,00	4,00
Pšenični otrobi (%)	6,00	/	/
Sojine tropine (44 % SB) (%)	28,46	15,45	32,00
Laneno olje (%)	/	/	5,00
Sojin zdrob (%)	13,67	28,00	1,00
Lizin (%)	0,24	0,15	0,13
Metionin (%)	0,37	0,20	0,17
Treonin (%)	0,09	/	/
Monokalcijev fosfat (%)	1,01	1,50	1,30
Apnenec (%)	1,39	1,40	1,40
Sol (%)	0,27	0,30	0,30
Soda bikarbona (%)	0,13	/	/
Fitaza (%)	0,02	/	/
Ronozime VP (%)	0,02	/	/
Captex (%)	0,20	/	/
Premiks (%)	1,00	1,00	1,00
Izračunane vrednosti			
ME (MJ/kg)	12,45	13,00	13,40
SB (g/kg)	230,0	216,5	196,9
Lizin (g/kg)	14,4	9,3	15,0
Metionin (g/kg)	6,8	4,4	4,7
Kalcij (g/kg)	9,6	13,0	8,8
Fosfor-izkoristljivi (g/kg)	4,8	5,2	4,2

SB – surove beljakovine, ME – presnovljiva energija

Krmnim mešanicam je bil dodan premiks, ki je bil sestavljen glede na normative po Ross 308 Broiler Nutrition specifications (2014) in sicer za krmne mešanice štarter in grover, premiks štarter-grover ter za krmno mešanico finišer, premiks finišer (preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava premiksa

	Štarter-grover	Finišer
Vitamini		
A (IU/kg)	13.000	10.000
D (IU/kg)	5.000	4.500
E (IU/kg)	65	50*
K (mg/kg)	4	3
Biotin (mg/kg)	0,15	0,18
Holin (mg/kg)	1.700	1.600
Folna kislina (mg/kg)	2,0	1,90
Niacin (mg/kg)	60	60
Pantotenska kislina (mg/kg)	15	18
B ₁ tiamin (mg/kg)	4,0	2,50
B ₂ riboflavin (mg/kg)	9,0	6,50
B ₆ piridoksin (mg/kg)	4,0	3,20
B ₁₂ cianokobalamin (mg/kg)	0,017	0,017
Minerali		
Baker (Cu) (mg/kg)	15	16
Jod (I) (mg/kg)	1,0	1,25
Železo (Fe) (mg/kg)	40	20
Mangan (Mn) (mg/kg)	100	120
Selen (Se) (mg/kg)	0,30	0,25
Cink (Zn) (mg/kg)	100	110
Herbakoks	DA	DA

*vsebnost vitamina E po normativih Ross 308 Broiler Nutrition specifications (2014).

Odvzeli smo vzorce poskusnih krmnih mešanic vseh skupin ter z weendsko analizo določili kemijsko sestavo (preglednica 3) in z GC maščobnokislinsko sestavo (preglednica 4). V poskusnih krmnih mešanicah smo izmerili tudi vsebnost vitamina E, vitamina C in selena ter oksidativno stabilnost krme (MDA, ACL in ACW). Vsebnost vitamina C smo merili le v skupinah, kjer smo ga dodali v krmo (C in ECSe).

Preglednica 3: Kemijske analize poskusnih krmnih mešanic

	Dodatek					
	K	E	C	Se	ECSe	Fa
Suha snov (g/kg)	877,72	879,70	879,07	879,86	878,50	877,69
Surove beljakovine (g/kg)	183,93	186,01	188,14	183,20	189,74	179,83
Surove maščobe (g/kg)	59,80	58,18	59,63	62,40	58,87	60,19
Surova vlaknina (g/kg)	37,44	37,52	35,23	38,03	41,55	38,77
Surovi pepel (g/kg)	48,23	47,19	47,09	47,23	47,15	47,00
Brezdušični izvleček (g/kg)	548,32	550,81	548,98	549,01	541,18	551,90
Fosfor (g/kg)	5,87	5,89	5,89	5,27	5,87	5,72
Kalcij (g/kg)	7,70	7,23	7,20	7,23	7,17	7,63
Magnezij (g/kg)	1,06	1,05	1,06	1,03	1,07	1,04
Kalij (g/kg)	9,65	9,51	9,65	9,44	9,83	9,40
Natrij (g/kg)	1,89	1,75	2,08	1,53	1,83	1,91
Selen (mg/kg)	0,30	0,30	0,30	0,54	0,54	0,30
Vitamin C (mg/kg)	/	/	132,4	/	129,4	/
Vitamin E						
α-tokoferol (mg/kg)	51,2	277,5	55,2	45,9	241,6	58,3
γ-tokoferol (mg/kg)	31,3	34,2	31,8	31,0	35,1	32,7
δ-tokoferol (mg/kg)	2,2	3,2	2,9	3,0	3,5	2,9
MDA (μmol/kg)	42,09	50,36	37,77	39,45	47,72	45,18
ACL (μmol/kg)	350	310	360	350	370	330
ACW (μmol/kg)	5240	4836	6478	5183	5802	5611

Imena skupin so razložena na strani 14.

Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava poskusnih krmnih mešanic (g MK/100 g vsote MK)

Maščobna kislina	Dodatek					
	K	E	C	Se	ECSe	Fa
C14:0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
C16:0	9,92	10,03	10,02	9,94	10,13	10,14
Σ C16:1	0,16	0,16	0,14	0,16	0,16	0,16
C17:0	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07
C18:0	3,46	3,37	3,47	3,61	3,61	3,55
Σ C18:1	21,15	21,12	21,24	21,64	21,43	20,91
C18:2 n-6	33,51	34,25	33,74	33,67	33,77	33,29
C18:3 n-3	30,68	29,84	30,11	29,72	29,59	30,74
C19:1 n-9	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
C20:0	0,27	0,26	0,27	0,29	0,29	0,26
C20:1 n-9	0,24	0,24	0,21	0,25	0,24	0,22
C22:0	0,17	0,17	0,17	0,19	0,19	0,17
C22:1 n-9	0,17	0,16	0,21	0,14	0,19	0,16
C24:0	0,15	0,15	0,17	0,17	0,16	0,14
Vsote						
NMK	14,12	14,13	14,25	14,33	14,52	14,42
ENMK	21,78	21,78	21,90	22,29	22,12	21,55
VNMK	64,10	64,09	63,85	63,39	63,36	64,03
n-3 VNMK	30,64	29,84	30,11	29,72	29,59	30,74
n-6 VNMK	33,46	34,25	33,74	33,67	33,77	33,29
n-6/n-3 VNMK	1,09	1,15	1,12	1,13	1,14	1,08

NMK – nasičene maščobne kisline, ENMK – enkrat nenasicičene maščobne kisline,

VNMK – večkrat nenasicičene maščobne kisline

Imena skupin so razložena na strani 14.

Kakovost lanenega olja smo preverili tako, da smo z GC določili maščobnokislinsko sestavo in s HPLC izmerili vsebnost vitamina E (preglednica 5).

Preglednica 5: Maščobnokislinska sestava (g MK/100 g vsote MK) in vsebnost vitamina E (mg/100g) v lanenem olju

Maščobna kislina	Laneno olje
C14:0	0,05
C16:0	6,02
Σ C16:1	0,12
C17:0	0,05
C17:1 n-7	0,04
C18:0	4,09
Σ C18:1	18,78
C18:2 n-6	12,67
C18:3 n-6	0,03
C18:3 n-3	57,27
C20:0	0,17
C20:1 n-9	0,24
C20:2 n-6	0,01
C21:1 n-9	0,05
C22:0	0,11
C22:1 n-9	0,21
C24:0	0,08
Vsote	
NMK	10,58
ENMK	19,43
VNMK	69,98
n-3 VNMK	57,27
n-6 VNMK	12,71
n-6/n-3 VNMK	0,22
Vitamin E	
α -tokoferol	< 0,5
γ -tokoferol	29,76
δ -tokoferol	1,52

NMK – nasičene maščobne kisline, ENMK – enkrat nenasicičene maščobne kisline,
VNMK – večkrat nenasicičene maščobne kisline

3.1.3 Izvedba poskusa

Živali smo naselili v skupinske oddelke opremljene s krmilniki in nipelj napajalnim sistemom. Krmljene so bile po volji. Prvih 20 dni so bile živali krmljene z enako krmno mešanico, šarter in grover, potem pa so bile krmljene z različnimi krmnimi mešanicami odvisno od poskusne skupine. Krmne mešanice so glede na skupino vsebovale različne dodatke. Kot dodatek vitamina E smo uporabili Rovimix E50 (DSM), kot dodatek vitamina C Rovimix Stay-C35 (DSM), kot dodatek selena Alkosel R397 (Lallemand) in kot dodatek tanina Farmatan BCO (Tanin Sevnica, d.d.). Farmatan BCO je kombinacija ekstrakta lesa sladkega kostanja in kalcijevega butirata, ki vsebuje 75 % hidrolizirajočih taninov (elagitaninov), 15 % enostavnih sladkorjev, vezano vodo in minerale. Med tanini prevladujeta veskalagin in kastalagin ter njuna metabolita veskalin in kastalin (Frankič, 2009).

Tedensko smo individualno spremljali maso živali in prirast ter po oddelkih zauživanje in izkoriščanje krme. Na koncu poskusa smo 12 živalim na skupino (skupaj 72 živalim) odvzeli vzorce krvi.

3.1.4 Odvzem krvi za analize

Kri smo jemali v vakumske epruvete VACUETTE (Greiner Bio-One, Avstrija). Epruvete so vsebovale različne antikoagulante v odvisnosti od zahteve analize, za katero je bila kri namenjena. Za določanje malondialdehyda, vitamina E in vitamina C v plazmi smo uporabili epruvete številka 455038 (9 ml). Epruvete so vsebovale antikoagulant EDTA. Za določanje antioksidativne kapacitete v maščobi in v vodi topnih spojin v serumu pa smo uporabili epruvete številka 454067 (4 ml), z aktivatorjem koagulacije.

Plazmo smo pridobili s centrifugiranjem krvi 10 minut pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $3000 \times g$. Za določitev koncentracije vitamina C smo $250\text{ }\mu\text{l}$ plazme odpipetirali v $1,5\text{ ml}$ plastično posodico s pokrovčkom v kateri je bilo $250\text{ }\mu\text{l}$ 10 % metafosforne kisline (MPK). Preostalo plazmo smo prenesli v dve $1,5\text{ ml}$ posodici s pokrovčkom in jo shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiz.

Po odvzemu krvi smo serumske vakuete hranili na sobni temperaturi vsaj dve uri. Serum smo pridobili s centrifugiranjem krvi 10 minut pri sobni temperaturi in $3300 \times g$. Serum smo prenesli v dve $1,5\text{ ml}$ posodici s pokrovčkom in ga shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiz.

3.2 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE VITAMINA E

Za določanje koncentracije izomer vitamina E (α -, γ - in δ -tokoferol) s HPLC reverzno fazo smo uporabili metodo, ki jo navajajo Abidi in Mounts (1997) ter Ruperez in sod. (2001).

3.2.1 Določanje koncentracije vitamina E v vzorcih krme in krvne plazme

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V stekleno epruveto z navojem smo zatehtali 300 mg krme. Dodali smo 2 ml etanola, 0,9 ml 2,2 % raztopine askorbinske kisline v vodi in 0,3 ml raztopine KOH. Epruvete smo zaprli s pokrovčki, jih dobro premešali na vrtinčniku in 15 min segrevali pri 70 °C v grelnem bloku. Po končanem segrevanju smo epruvete ohladili v kadi z mrzlo vodo. Nato smo dodali 1,0 ml ultra čiste (milli Q) vode, 0,3 ml ledocetne kisline in 3 ml heksana. Epruvete smo dobro zaprli s pokrovčki, jih 15 min mešali na stresalniku, ter centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi in 3000 obr./min. V nove steklene epruvete z navojem smo odpipetirali 1 oz. 1,5 ml heksanske faze. Heksan smo odparili v sistemu za odparevanje z dušikom pri temperaturi 40 °C. Po odparevanju smo v epruvete s suhim preostankom dodali 1,5 ml absolutnega etanola. Epruvete smo dobro zaprli s pokrovčki in jih 15 min mešali na stresalniku. Etanolni ekstrakt vzorca smo s pomočjo brizg prefiltrirali skozi 0,45 µm Milliporove filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje koncentracije vitamina E v plazmi smo vzorce pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V stekleno epruveto z navojem smo odpipetirali 200 µl plazme. Dodali smo 2 ml etanola z BHT, 0,9 ml 2,2 % raztopine askorbinske kisline v vodi in 2,3 ml heksana. Epruvete smo zaprli s pokrovčki in jih dobro premešali na vrtinčniku. Nato smo jih 15 min mešali na stresalniku, ter centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi in 3000 obr/min. V nove steklene epruvete z navojem smo odpipetirali 1 oz. 1,5 ml heksanske faze. Heksan smo odparili v sistemu za odparevanje z dušikom pri temperaturi 40 °C. Po odparevanju smo v epruvete s suhim preostankom dodali 1,2 ml absolutnega etanola. Epruvete smo zaprli s pokrovčki, jih dobro premešali z vrtinčnikom in za 15 min dali v UZ ledeno kopel. S pomočjo brizg smo vzorce prefiltrirali skozi 0,45 µm Milliporove filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje koncentracije vitamina E s HPLC smo uporabili aparat 1260 Infinity (Agilent Technologies), ki je opremljen s črpalko (1260 Infinity quaternary pump (Agilent)), avtomatskim vzorčevalnikom (1260 Infinity ALS) opremljenim s termostatom (1290 Infinity thermostat (Agilent)), UV/VIS detektorjem (1260 Infinity VWD VL + (Agilent)) in detektorjem za merjenje fluorescence (1260 Infinity FLD (Agilent)). Rezultate smo ovrednotili s programom Agilent openLab SDS ChemStation edition (Rev. C.01.05 (35)). Ločba je potekala na koloni Prodigy ODS2, 250 x 4.6 mm i.d., 5µm (Phenomenex, ZDA) s predkolono Prodigy ODS2 (Phenomenex, ZDA). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1,5 ml/min. Za mobilno fazo smo uporabili metanol. Pri analizi krme smo injicirali 20 µl vzorca, pri analizi plazme pa 50 µl vzorca. Temperatura kolone in vzorcev je bila enaka sobni temperaturi. Umeritveno krivuljo za določanje izomer vitamina E smo pripravili razredčevanjem standardnih raztopin tokoferolov (Tocopherol set 613424, Calbiochem).

3.3 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE VITAMINA C

Koncentracije vitamina C smo določili s HPLC reverzno fazo po metodi, ki jo navajajo Wechtersbach (2005) ter Wechtersbach in Cigič (2007).

3.3.1 Določanje koncentracije vitamina C v vzorcih krme in krvne plazme

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo zatehtali 200 mg krme. Dodali smo 1,3 ml 2 % MPK in 10 µl tris (2-karboksietil) fosfina (TCEP). Epruvete smo dobro premešali na vrtinčniku ter centrifugirali 10 min pri 22 °C in 20.000 x g. Po centrifugiranju smo supernatant s pomočjo brizg prefiltrirali skozi 0,45 µm Milliporove filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje koncentracije vitamina C v vzorcih krvne plazme smo vzorce pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. Zamrznjenim vzorcem (plazma z dodatkom 10 % MPK) smo dodali 1 ml 2 % MPK in 10 µl TCEP. Vse skupaj smo dobro premešali na vrtinčniku in centrifugirali 10 min pri sobni temperaturi in 20.000 x g. Po centrifugiranju smo supernatant s pomočjo brizg prefiltrirali skozi 0,45 µm Milliporove filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje koncentracije vitamina C s HPLC smo uporabili aparat 1260 Infinity (Agilent Technologies), ki je opremljen s črpalko (1260 Infinity quaternary pump (Agilent)), avtomatskim vzorčevalnikom (1260 Infinity ALS) opremljenim s termostatom (1290 Infinity thermostat (Agilent)), UV/VIS detektorjem (1260 Infinity VWD VL + (Agilent)) in detektorjem za merjenje fluorescence (1260 Infinity FLD (Agilent)). Rezultate smo ovrednotili s programom Agilent openLab SDS ChemStation edition (Rev. C.01.05 (35)). Ločba je potekala na koloni Synergi 4µ Hydro- RP 80 A (Phenomenex, ZDA) s predkolono SecurityGuard AQ C18, 4 x 3.0 mm (Phenomenex, ZDA). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1 ml/min. Pri analizi krme in plazme smo injicirali 100 µl vzorca. Temperatura kolone in vzorcev je bila enaka sobni temperaturi. Za mobilno fazo smo uporabili 2,5 mmolarno raztopino žveplove kisline (H_2SO_4). Umeritveno krivuljo smo pripravili razredčevanjem standardne raztopine vitamina C, ki smo jo pripravili z raztopljanjem čistega vitamina C (>99%).

3.4 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA

Za določanje MDA s HPLC reverzno fazo smo uporabili metodo, ki jo navajajo Wong in sod. (1987), z modifikacijami po Chirico (1994) in Fukunaga in sod. (1995).

3.4.1 Določanje koncentracije malondialdehida (MDA) v vzorcih krme in krvne plazme

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo zatehtali 100 mg krme. Dodali smo 0,5 ml raztopine BHT v metanolu in 1 ml 5 % triklorocetne kisline (TCK). Epruvete smo 15 min mešali na stresalniku (30 obr/min) in jih po mešanju prenesli v centrifugo. Centrifugirali smo jih 15 min pri 4 °C in 15.000 obr/min. Za derivatizacijo smo iz plastičnih epruvet v steklene epruvete prenesli 0,75 ml supernatanta in dodali 1,5 ml 0,6 % raztopine TBK. Epruvete smo prenesli v grelni blok za 60 min pri 90 °C. Po derivatizaciji smo epruvete ohladili v kadi z mrzlo vodo. Derivatizirane vzorce smo s pomočjo brizg prefiltiriali skozi 0,45 µl filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje koncentracije malondialdehida v vzorcih krvne plazme smo vzorce pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo odpipetirali 400 µl plazme oz. ultra čiste (milli Q) vode pri slepem vzorcu, 20 µl 0,2 % raztopine BHT v absolutnem etanolu in 10 µl koncentrirane raztopine H_3PO_4 zaobarjanje. Epruvete smo dobro premešali na vrtinčniku in jih pustili stati 15 min. Dodali smo 600 µl absolutnega etanola, zopet premešali na vrtinčniku in centrifugirali 15 min pri 4 °C in 15000 x g. V steklene epruvete z navojem smo odpipetirali 0,5 ml 0,88 M raztopino H_3PO_4 , 0,5 ml 0,6 % raztopine TBK v ultra čisti (milli Q) vodi in 0,7 ml centrifugiranega vzorca. Epruvete smo zaprli s pokrovčki, premešali in postavili v termostatski blok za 60 min pri 95 °C. Vzorce smo ohladili v kadi z mrzlo vodo in jih s pomočjo 5 ml brizg prefiltiriali skozi 0,45 µm Milliporove filtre v 2 ml steklene viale za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določanje MDA s HPLC smo uporabili aparat 1260 Infinity (Agilent Technologies), ki je opremljen s črpalko (1260 Infinity quaternary pump (Agilent)), avtomatskim vzorčevalnikom (1260 Infinity ALS) opremljenim s termostatom (1290 Infinity thermostat (Agilent)), UV/VIS detektorjem (1260 Infinity VWD VL + (Agilent)) in detektorjem za merjenje fluorescence (1260 Infinity FLD (Agilent)). Rezultate smo ovrednotili s programom Agilent openLab SDS ChemStation edition (Rev. C.01.05 (35)). Ločevanje kompleksa MDA-TBK₂ je potekalo na koloni HyperClone ODS (C18), 150 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, ZDA) s predkolono HyperClone ODS (C18) (Phenomenex, ZDA). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1 ml/min, za analizo enega vzorca pa smo potrebovali 8 min. Pri analizi krme smo injicirali 20 µl vzorca, pri analizi plazme pa 100 µl vzorca. Temperatura kolone in vzorcev je bila enaka sobni temperaturi. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico metanola (MeOH) in 50 mM kalijevega dihidrogen fosfatnega pufrja (KH_2PO_4) (pH=6,9), v razmerju 35:65. pH pufra smo uravnnavali z 1 M KOH. Umeritveno krivuljo smo pripravili s standardi TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropan) v koncentacijskem območju, ki je bilo odvisno od koncentracije MDA v vzorcih.

3.5 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE ANTOOKSIDATIVNE KAPACITETE

Antioksidativno kapaciteto v maščobi topnih spojin smo določali po protokolu za določanje z ACL-reagenčnimi kompleti (Analytik Jena, Jena, Nemčija), antioksidativno kapaciteto v vodi topnih spojin pa po protokolu za določanje z ACW-reagenčnimi kompleti (Analytik Jena, Jena, Nemčija).

3.5.1 Določanje antioksidativne kapacitete v maščobi topnih antioksidantov (ACL) v vzorcih krme

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo zatehtali 200 mg krme. Dodali smo 1 ml heksana, vse skupaj dobro premešali na vrtinčniku in 10 min mešali na stresalniku. Nato smo vzorce centrifugirali 10 min pri 4 °C in 10.000 obr/min. Supernatant smo s Hamiltonovo iglo prenesli v nove epruvete. Do analiz smo jih shranili v temi na hladnjem. V plastično posodico smo odpipetirali 2,3 ml metanola in 0,2 ml pufra, premešali na vrtinčniku in dodali 20 µl vzorca. Tik pred merjenjem smo dodali 25 µl luminola, dobro premešali in posodico vstavili v aparat Photochem.

3.5.2 Določanje antioksidativne kapacitete v maščobi topnih antioksidantov (ACL) v vzorcih seruma

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo odpipetirali 200 µl seruma in dodali 200 µl metanola. Vse skupaj smo dobro premešali na vrtinčniku in centrifugirali 10 min pri 4 °C in 25.000 obr/min. Po centrifugiranju smo vzorce do analiz shranili v temi na ledu. V plastično posodico smo odpipetirali 2,3 ml metanola in 0,2 ml pufra, premešali na vrtinčniku in dodali 10 µl vzorca. Tik pred merjenjem smo dodali 25 µl luminola, dobro premešali in posodico vstavili v aparat Photochem.

Pri določanju antioksidativne kapacitete v maščobi topnih spojin v vzorcih krme in seruma smo aparat pred merjenjem umerili z analiziranjem standardnih raztopin antioksidantov. Za kalibriranje instrumenta smo uporabili Trolox. Injicirali smo ga v različnih koncentracijah, da smo dobili umeritveno krivuljo v primernem koncentracijskem območju .

3.5.3 Določanje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov (ACW) v vzorcih krme

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo zatehtali 100 mg krme. Dodali smo 1 ml 2 % vodne raztopine metafosforne kisline, dobro premešali na vrtinčniku in 30 min mešali na stresalniku. Po mešanju smo vzorce centrifugirali 10 min pri 4 °C in 10.000 obr/min. 20 µl supernatanta smo odpipetirali v nove epruvete, ga razredčili z 980 µl ultra čiste (milli Q) vode, vse dobro premešali na vrtinčniku in do analiz shranili v temi na ledu. V plastično posodico

smo odpipetirali 1,5 ml ultra čiste (milli Q) vode in 1 ml pufra, premešali na vrtinčniku in dodali 40 µl vzorca. Tik pred merjenjem smo dodali 25 µl luminola, dobro premešali in posodico vstavili v aparat Photochem.

3.5.4 Določanje antioksidativne kapacitete v vodi topnih antioksidantov (ACW) v vzorcih seruma

Vzorce smo pripravili v dveh vzporednih ponovitvah. V 1,5 ml plastične posodice s pokrovčkom smo odpipetirali 25 µl seruma, dodali 400 µl ultra čiste (milli Q) vode in dobro premešali na vrtinčniku. Vzorce smo do analiz shranili v temi na ledu. V plastično posodico smo odpipetirali 1,5 ml ultra čiste (milli Q) vode in 1 ml pufra, premešali na vrtinčniku in dodali 25 µl vzorca. Tik pred merjenjem smo dodali 25 µl luminola, dobro premešali in posodico vstavili v aparat Photochem.

Pri določanju antioksidativne kapacitete v vodi topnih spojin v vzorcih krme in krvne plazme smo aparat pred merjenjem umerili z analiziranjem standardnih raztopin antioksidantov. Za kalibriranje instrumenta smo uporabili askorbinsko kislino. Injicirali smo jo v različnih koncentracijah, da smo dobili umeritveno krivuljo v primerenem koncentracijskem območju.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT 9.3 (SAS Institute, ZDA). S proceduro MEANS smo izračunali osnovne statistične parametre, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. S proceduro GLM (splošni linearni modeli) smo po metodi najmanjših kvadratov razvili statistični model, v katerega smo vključili sistematski vpliv skupine. Ali so razlike med skupinami statistično značilne nam pove p-vrednost. Razlike med skupinami smo ocenili s pomočjo linearnih kontrastov in Tukeyevega testa. Rezultate proizvodnih lastnosti smo podali kot povprečne vrednosti (\bar{X}) ± standardni odklon (SD). Rezultate vsebnosti vitaminov in oksidativnega statusa pa smo podali kot ocenjene srednje vrednosti (LSM) ± standardno napako.

Statistični model smo uporabili za naslednje lastnosti: telesna masa piščancev, povprečni dnevni prirast, povprečno dnevno zauživanje krme, izkoriščanje krme, koncentracija izomer vitamina E, vitamina C in MDA v plazmi ter koncentracija ACL in ACW v serumu.

$$y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots (1)$$

y_{ij} - opazovana lastnost

μ - srednja vrednost

S_i - vpliv i-te skupine ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$)

e_{ij} - ostanek

4 REZULTATI

4.1 PROIZVODNE LASTNOSTI PIŠČANCEV

V prvih petih tednih poskusa med skupinami nismo zaznali statistično značilnih razlik v telesni masi živali. Na koncu poskusa so bile v povprečju najtežje živali iz kontrolne skupine. Nekaj lažje so bile živali iz skupin C in Se ter še lažje živali iz skupin Fa in E, vendar med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v masi živali. Kombinacija dodatkov je statistično značilno znižala maso živali v primerjavi s kontrolno skupino. Živali iz te skupine so bile na koncu poskusa najlažje (preglednica 6).

Preglednica 6: Telesne mase piščancev (g) od 3. do 6. tedna pitanja ($\bar{X} \pm SD$)

Teden	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
3.	760 ±42	766 ±29	769 ±33	784 ±29	782 ±23	785 ±33	0,742
4.	1242 ±83	1203 ±58	1219 ±56	1273 ±67	1261 ±36	1253 ±85	0,565
5.	1860 ±97	1820 ±48	1853 ±65	1895 ±88	1828 ±35	1877 ±65	0,539
6.	2394 ^a ±106	2312 ^{ab} ±40	2370 ^{ab} ±83	2371 ^{ab} ±50	2276 ^b ±56	2354 ^{ab} ±87	0,034

Imena skupin so razložena na strani 14.

^{a,b} Skupine, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

V obdobju šarter-grover, ko so bile živali v vseh skupinah krmljene z enako krmno mešanico šarter in grover, med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v povprečnem dnevnom prirastu. Ravno tako kot pri masi živali, dodatki, ki smo jih v krmo dodali posamezno, niso vplivali na povprečni dnevni prirast, ne glede na obdobje krmljenja. Čeprav so bili prirasti v primerjavi s kontrolno skupino pri vseh skupinah manjši, pa je na prirast statistično značilno vplivala le kombinacija dodatkov (ECSe). V obdobju finišer in v celotnem obdobju trajanja poskusa, so najslabše priraščale živali iz skupine ECSe (preglednica 7).

Preglednica 7: Povprečni dnevni prirasti (g) piščancev v različnih obdobjih pitanja ($\bar{X} \pm SD$)

	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
1. do 20. dan	35 ±1	34 ±1	35 ±2	35 ±1	35 ±2	36 ±2	0,784
21. do 40. dan	90 ^a ±6	86 ^{ab} ±1	89 ^a ±3	88 ^a ±2	84 ^b ±2	87 ^{ab} ±3	0,044
1. do 40. dan	60 ^a ±3	58 ^{ab} ±1	60 ^{ab} ±2	60 ^{ab} ±1	57 ^b ±1	59 ^{ab} ±2	0,036

Imena skupin so razložena na strani 14.

^{a,b} Skupine, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

Živali so bile krmljenje po volji. V obdobju šarter-grover med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v povprečnem dnevnom zauživanju krme, so pa nekaj manj krme zaužile živali iz skupine E in ECSe. Tako v obdobju finišer, kot v celotnem obdobju so največ krme zaužile živali iz kontrolne skupine, nekoliko manj pa živali iz skupin C, Se in Fa. Razlika v zaužiti krmi ni bila statistično značilna. Živali iz skupine E in ECSe so zaužile manj krme kot živali iz ostalih skupin, vendar je na zauživanje krme statistično značilno vplivala le kombinacija dodatkov, tako v obdobju finišer kot v celotnem obdobju trajanja poskusa (preglednica 8).

Preglednica 8: Povprečno dnevno zauživanje krme (g) v različnih obdobjih pitanja ($\bar{X} \pm SD$)

	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
1. do 20. dan	49 ±1	48 ±1	49 ±1	49 ±1	49 ±1	50 ±2	0,382
21. do 40. dan	155 ^a ±6	148 ^{ab} ±3	154 ^a ±3	153 ^a ±2	147 ^b ±3	152 ^a ±5	0,020
1. do 40. dan	98 ^a ±3	94 ^{ab} ±2	98 ^a ±2	97 ^a ±1	94 ^b ±2	97 ^a ±3	0,028

Imena skupin so razložena na strani 14.

^{a,b} Skupine, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

Manjše povprečno dnevno zauživanje krme živali skupine ECSe pojasni statistično značilno razliko v nižji povprečni telesni masi živali in nižjem povprečnem dnevnom prirastu, v primerjavi s kontrolno skupino.

Med skupinami v obdobju šarter-grover ni bilo statistično značilnih razlik v izkoriščanju krme. To pomeni, da so vse živali porabile enako količino krme za 1 kg prirasta. Tudi v obdobju finišer in celotnem obdobju trajanja poskusa, noben dodatek ali njihova kombinacija ni statistično značilno vplivala na izkoriščanje krme (preglednica 9).

Preglednica 9: Izkoriščanje krme piščancev med pitanjem v različnih obdobjih ($\bar{X} \pm SD$)

	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
1. do 20. dan	1,41 ±0,03	1,40 ±0,03	1,42 ±0,05	1,39 ±0,04	1,40 ±0,02	1,40 ±0,05	0,885
21. do 40. dan	1,73 ±0,06	1,72 ±0,04	1,73 ±0,07	1,73 ±0,03	1,76 ±0,02	1,75 ±0,04	0,818
1. do 40. dan	1,63 ±0,04	1,62 ±0,02	1,64 ±0,06	1,62 ±0,02	1,64 ±0,01	1,64 ±0,03	0,891

Imena skupin so razložena na strani 14.

V času poskusa smo zaradi pogina izločili 1,17 % živali iz kontrolne skupine in 1,17 % živali iz skupine Fa. Povprečna ekonomska učinkovitost reje v poskusu je bila 369.

4.2 VSEBNOST VITAMINOV V KRVNI PLAZMI

Zanimalo nas je, ali dodajanje različnih vitaminov v krmo poveča njihovo vsebnost v krvni plazmi, zato smo v krvni plazmi izmerili koncentracijo vitaminov E in C (preglednica 11).

Preglednica 10: Vsebnost vitaminov E in C v krvni plazmi piščancev (LSM ± standardna napaka)

	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
Vitamin E							
α-tokoferol (µg/ml)	9,18 ^a ±1,47	24,15 ^b ±1,54	8,70 ^a ±1,47	6,79 ^a ±1,54	26,28 ^b ±1,54	6,77 ^a ±1,47	<0,001
γ-tokoferol (µg/ml)	1,00 ^a ±0,08	0,61 ^b ±0,08	1,04 ^a ±0,08	0,89 ^{ab} ±0,08	0,63 ^b ±0,08	0,82 ^{ab} ±0,08	<0,001
Vitamin C (µg/ml)	18,24 ±0,74	17,72 ±0,74	18,90 ±0,74	16,84 ±0,77	17,79 ±0,74	18,30 ±0,74	0,527

Imena skupin so razložena na strani 14.

^{a,b} Skupine, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$).

Dodatek vitamina E v krmo je zvišal koncentracijo α-tokoferola v krvni plazmi, saj so imele živali v obeh skupinah, katerim smo v krmo dodali vitamin E (E in ECSe), statistično značilno več α-tokoferola v krvni plazmi, kot skupine brez dodatka vitamina E. Najvišjo koncentracijo α-tokoferola v krvni plazmi so imele živali iz skupine ECSe, nekaj manj α-tokoferola so imele živali iz skupine E, najmanj α-tokoferola v krvni plazmi pa so imele živali iz skupin Se in Fa. Dodatek vitamina C, Se in Fa, ni statistično značilno vplival na koncentracijo α-tokoferola v krvni plazmi (preglednica 11).

Prav nasprotno je pri γ-tokoferolu dodatek vitamina E v krmo, statistično značilno znižal vsebnost γ-tokoferola v krvni plazmi glede na kontrolno skupino. Najmanj γ-tokoferola so imele živali iz skupin ECSe in E. Živali iz skupin Se in Fa so imele ravno tako nekoliko

manj γ -tokoferola v krvni plazmi glede na kontrolno skupino, vendar razlike niso bile statistično značilne. Na vsebnost vitamina C ni statistično značilno vplival noben posamezni dodatek ali njihova kombinacija (preglednica 11).

4.3 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA) V KRVNI PLAZMI IN ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA V MAŠČOBAH (ACL) IN V VODI (ACW) TOPNIH ANTIOKSIDANTOV V SERUMU

Oksidativni status pitovnih piščancev smo ugotavljali z merjenjem koncentracije malondialdehida (MDA) v krvni plazmi ter antioksidativne kapacitete v maščobah (ACL) in v vodi (ACW) topnih antioksidantov v krvnem serumu (preglednica 12).

Preglednica 11: Vsebnosti MDA v krvni plazmi ter ACL in ACW v krvnem serumu piščancev (LSM \pm standardna napaka)

	Dodatek						p
	K	E	C	Se	ECSe	Fa	
MDA (nmol/ml)	0,44 ^a $\pm 0,03$	0,33 ^b $\pm 0,03$	0,45 ^a $\pm 0,03$	0,42 ^{ab} $\pm 0,03$	0,31 ^b $\pm 0,03$	0,42 ^a $\pm 0,03$	<0,001
ACL (nmol/ml)	324 ^a ± 9	353 ^{ab} ± 9	370 ^b ± 9	334 ^{ab} ± 10	354 ^{ab} ± 9	336 ^{ab} ± 9	0,010
ACW (nmol/ml)	375 ^{ab} ± 26	378 ^{ab} ± 26	467 ^a ± 26	412 ^{ab} ± 27	412 ^{ab} ± 26	350 ^b ± 26	0,046

Imena skupin so razložena na strani 14.

^{a,b,c} Skupine, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$).

Najnižjo koncentracijo MDA v krvni plazmi so imele živali iz skupine ECSe in iz skupine E. Koncentracija MDA v krvni plazmi je bila pri obeh skupinah statistično značilno nižja kot pri živalih iz kontrolne skupine. To pomeni, da je dodatek vitamina E v krmi, dodan posamezno, ali v kombinaciji z drugimi dodatki, vplival na znižanje koncentracije MDA v krvni plazmi. Dodatek vitamina C, selena ali Farmatana BCO ni statistično značilno vplival na koncentracijo MDA v krvni plazmi (preglednica 12).

Dodatek vitamina E, selena, kombinacije dodatkov in Farmatana BCO, niso statistično značilno vplivale na ACL v primerjavi s kontrolno skupino. Najvišjo ACL so imele živali, ki smo jim v krmo dodali vitamin C, ki je kot edini dodatek statistično značilno vplival na ACL. Glede na kontrolno skupino, na ACW noben dodatek ali njihova kombinacija, ni imel statistično značilnega vpliva. Razlika med skupino C in Fa je bila statistično značilna. (preglednica 12).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali dodatki vitamina E, vitamina C, selena in njihova kombinacija ter Farmatana BCO, vplivajo na proizvodne lastnosti in oksidativni status pitovnih piščancev, ki so dobivali krmo z velikim deležem VNMK in bili s tem izpostavljeni povečanemu oksidativnemu stresu.

Živali v intenzivnih rejah so pogosto izpostavljene številnim stresnim dejavnikom, ki so lahko posledica raznih bolezenskih stanj, neprimernega okolja ali prehrane. Ti dejavniki, med katere štejemo tudi oksidativni stres, zmanjšajo produktivnost in poslabšajo zdravstveno stanje živali (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Eden glavnih povzročiteljev oksidativnega stresa pri pitovnih piščancih je vključevanje večjih količin maščob v krmo. Zaradi velikih energijskih potreb pitovnih piščancev v krmo dodajamo maščobe predvsem v obliki rastlinskih olj, ki večinoma vsebujejo veliko VNMK. Poznano je, da VNMK delujejo prooksidativno in s tem nagibajo ravnotežje med oksidanti in antioksidanti v korist oksidantov, kar privede do oksidativnega stresa (Voljč in sod., 2011).

V poskusu smo oksidativni stres, od 21. dne dalje, izzvali z dodatkom 5 % hladno stiskanega lanenega olja v krmo živali. Laneno olje je vsebovalo 69,98 % VNMK, od tega 57,27 % n-3 VNMK, razmerje med n-6 in n-3 VNMK pa je znašalo okrog 1:4 (0,22). Vir n-3 VNMK v lanenem olju je predstavljala α -linolenska kislina. α -linolenska kislina je esencialna maščobna kislina, saj iz nje v organizmu nastaneta eikozapentaenojska (EPK) in dokozaheksanojska (DHK) kislina, ki sta pomembni sestavini celičnih membran ter služita kot predstopnja protivnetnih eikozanoidov (Wall in sod., 2010). Krma bogata z VNMK, še posebej z n-3 VNMK, ugodno vpliva na zdravje, vendar pa se ob povečanem vnosu VNMK v krmo, zaradi njihovega prooksidativnega delovanja, povečajo potrebe po antioksidantih.

Za preprečevanje negativnih vplivov oksidativnega stresa, ki smo ga povzročili z dodatkom lanenega olja, smo živalim v krmo dodali vitamin E, vitamin C, selen ter Farmatan BCO. Vitamin E smo izbrali, ker je najpomembnejši v maščobah topen antioksidant, za katerega je znano, da preprečuje nastanek verižnih reakcij pri oksidaciji ter lovi peroksilne proste radikale. Pri oddaji vodikovega protona lipidnim peroksilnim radikalom, nastane α -tokoferoksilni radikal, ki je relativno stabilen, nereaktivен in veliko bolj obstojen kot radikali, ki nastanejo pri oksidaciji VNMK (Eitenmiller in Lee, 2004).

Če je vitamin E najpomembnejši v maščobah topen antioksidant, lahko za vitamin C trdimo, da je najpomembnejši v vodi topen antioksidant. Njegova najpomembnejša lastnost je reverzibilni oksidacijsko-reduksijski proces med askorbinsko in dehidroaskorbinsko kislino. Vitamin C je sposoben reducirati oksidirane oblike vitamina E nazaj v njegovo

aktivno obliko in ga s tem narediti ponovno sposobnega za lovljenje prostih radikalov. Druga pomembna funkcija vitamina C pa je inaktivacija kisikovih prostih radikalov (Rudan-Tasič, 2000). Antioksidativne lastnosti selena so nas zanimale predvsem v povezavi selena z antioksidativnimi encimi. Selen je namreč sestavni del encima glutation peroksidaza, za katerega je znano, da ščiti celice pred prostimi radikali. Dodajanje na organske spojine vezanega selena v krmo živali poviša vsebnost selena v tkivih in mišicah. Selen bi lahko dodajali v krmo ne samo zaradi sodelovanja v antioksidativnih procesih, temveč tudi z namenom pridobivanja živil s funkcionalnimi lastnostmi (Dvorska in Surai, 2006). Ker se v zadnjih letih vse več pozornosti namenja naravnim prehranskim dodatkom, smo v poskus vključili tudi tanine (Farmatan BCO). Tanini so skupina rastlinskih polifenolov, topnih v vodi, ki imajo v rastlinah različne fiziološke in kemijske lastnosti. V prehrani živali se pogosto uporabljajo zaradi njihovega antimikrobnega delovanja ter ugodnega vpliva na prebavni trakt, nas pa so zanimale predvsem njihove antioksidativne lastnosti. Z zaviranjem nastanka prostih radikalov lahko tanini preprečujejo lipidno peroksidacijo (Mangan, 1988; Jansman, 1993).

V obdobju šarter-grover, ko so bile vse živali krmljene z enako krmno mešanico, med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v zauživanju krme, prirastu, telesnih masah živali in izkoriščanju krme. Rezultati so pričakovani, saj so bile vse živali krmljene z enako krmno mešanico. V obdobju finišer in v celotnem obdobju posamezni dodatki niso vplivali na zauživanje krme, prirast, maso živali in izkoriščanje krme. Dobljeni rezultati potrjujejo ugotovitve, da dodatek vitamina E (Guo in sod., 2001), vitamina C (Cinar in sod, 2014), selena (Gružauskas in sod., 2014) ali Farmatana (Rezar in Salobir, 2014; Voljč in sod., 2013), ne vpliva na proizvodne lastnosti pitovnih piščancev. Živali v skupini, ki smo jim v krmo dodali kombinacijo vitamina E, vitamina C in selena, so zaužile manj krme kot živali v kontrolni skupini. Posledica manjšega zauživanja krme se je pokazala pri prirastu in masi živali. Živali iz skupine ECSe so slabše priraščale in bile lažje od živali iz kontrolne skupine. Podobne rezultate so v primerljivem poskusu dobili Tawfeek in sod. (2014). Pitovne piščance so izpostavili toplotnemu stresu. Zanimalo jih je, kako kombinacija vitamina E in vitamina C vpliva na proizvodne lastnosti. V krmo so dodali 250 mg/kg vitamina E in 250 mg/kg vitamina C. V obdobju od 21. do 42. dne, so živali zaužile statistično manj krme, v prirastu pa v primerjavi s kontrolno skupino niso ugotovili razlik. Tudi v celotnem obdobju trajanja poskusa so živali zaužile manj krme kot kontrolna skupina, vendar razlika ni bila statistično značilna. Manjše zauživanje krme ni negativno vplivalo na maso živali in prirast, saj so bile živali na koncu poskusa težje, prav tako so bolje priraščale. Ugotovili so tudi, da ne glede na obdobje trajanja poskusa, dodatek vitamina E in vitamina C ni statistično značilno vplival na izkoriščanje krme.

Rezultati raziskav o vplivu kombinacije vitamina E in vitamina C na proizvodne lastnosti so nasprotujoči. Cinar in sod. (2014) ob enaki količini dodatkov v krmo (250 mg/kg vitamina E in 250 mg/kg vitamina C) kot Tawfeek in sod. (2014), pri pitovnih piščancih niso zaznali razlik v zauživanju krme, masi živali, prirastu in izkoriščanju krme. Nasprotno

pa Ipek in sod. (2007), ob podobni količini dodatkov (240 mg/kg vitamina E in 240 mg/kg vitamina C), ki so jih dodali v krmo prepelicam, navajajo boljše zauživanje krme, višje mase živali, višje priraste in boljše izkoriščanje krme.

Nekoliko manjše zauživanje krme smo v našem poskusu opazili tudi v skupini z dodatkom vitamina E, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p < 0,1$). Manjše zauživanje krme pri skupini E morda nakazuje na to, da bi lahko na manjše zauživanje krme, pri kombinaciji dodatkov, vplival vitamin E. Za potrditev te trditve, bi morali izvesti več raziskav o vplivu vitamina E na zauživanje krme oz. na proizvodne lastnosti.

Poleg vplivov različnih dodatkov na proizvodne lastnosti nas je zanimal tudi njihov vpliv na oksidativni status in s tem na zdravje živali. Izmerili smo vsebnost vitamina E in vitamina C v krvni plazmi, saj smo pričakovali, da dodatki antioksidantov v krmo zvišajo njihovo vsebnost v telesu, ter s tem pomagajo zmanjšati oksidativni stres, ki je posledica velike vsebnosti maščob v krmi. Ugotovili smo, da dodatek vitamina E in njegova kombinacija z vitaminom C in selenom, povišata vsebnost α -tokoferola ter hkrati znižata vsebnost γ -tokoferola v krvni plazmi. Kot dodatek vitamina E smo uporabili sintetizirani dl- α -tokoferil acetat, zato so rezultati vsebnosti vitamina E pričakovani. α -tokoferol transferni protein namreč v jetrih selektivno prepozna α -tokoferol in ga vgradi v lipoproteine z zelo nizko gostoto (VLDL). Povečana vsebnost α -tokoferola tako prepreči vezavo γ -tokoferola v VLDL, kar privede do večjega obsega razgradnje γ -tokoferola s strani citokromov P450 (Jiang in sod., 2001). Tudi Voljč in sod. (2013) so ugotovili, da dodatek vitamina E v krmo pitovnih piščancev, zviša vsebnost α -tokoferola ter hkrati zniža vsebnost γ -tokoferola v krvni plazmi.

Živali iz skupine ECSe so imele statistično značilno višjo vsebnost vitamina E, kot živali iz kontrolne skupine. Med skupinama ECSe in E ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti vitamina E, kar kaže na to, da je za povišano vsebnost vitamina E v krvni plazmi pri skupini ECSe vpliva predvsem koncentracija v krmo dodanega vitamina E. Ostali dodatki na vsebnost vitamina E v krvni plazmi niso imeli statistično značilnega vpliva. Rezultati iz naše raziskave so primerljivi z nekaterimi ugotovitvami, da dodatek vitamina C pri pitovnih piščancih ne vpliva na vsebnost vitamina E v stegenski mišici (Skrivan in sod., 2012), dodatek selena pri pitovnih piščancih ne vpliva na vsebnost vitamina E v jetrih (Ozkan in sod., 2007) ter dodatek Farmatana BCO v krmo pitovnih piščancev ne vpliva na vsebnost vitamina E v plazmi, jetrih in prsnih mišic (Voljč in sod., 2013). Po drugi strani pa so Sahin in sod. (2003) v nasprotju z našimi rezultati ugotovili, da dodatek vitamina E pri prepelicah poviša vsebnost vitamina C v serumu, ter da dodatek vitamina C poviša vsebnost vitamina C in vitamina E v serumu. V našem poskusu noben dodatek in njihova kombinacija niso vplivali na vsebnost vitamina C v krvni plazmi. Razlog za to, da noben dodatek ni vplival na povišanje vsebnosti vitamina C v krvni plazmi, je morda povezan s skladiščenjem vitaminov v telesu. V maščobi topni antioksidanti se po zaužitju nalagajo v maščobnih tkivih. V vodi topni antioksidanti pa se v telesu ne nalagajo v večjih količinah

ampak se izločijo. Ker telo nima večjih zalog vodotopnih vitaminov, jih morajo živali dnevno zauživati s krmo.

Vpliv različnih antioksidantov in njihove kombinacije na oksidativni status pitovnih piščancev, smo poleg vsebnosti vitamina E in C, ugotavljali z merjenjem vsebnosti MDA v krvni plazmi ter ACL in ACW v krvnem serumu. V več raziskavah so potrdili, da dodatek vitamina E uspešno zniža vsebnost MDA v serumu pri pitovnih piščancih (Sahin in sod., 2001; Voljč in sod., 2011), nesnicah (Sahin in sod., 2002) in prepelicah (Sahin in sod., 2003). Tudi v naši raziskavi je dodatek vitamina E posamezno ali v kombinaciji znižal vsebnost MDA v krvni plazmi v primerjavi z ostalimi skupinami. Rezultati so pričakovani, saj je vitamin E najpomembnejši in najuspešnejši antioksidant pri odpravljanju negativnih vplivov lipidne peroksidacije in s tem oksidativnega stresa (Eitenmiller in Lee, 2004). Zato je tudi največkrat uporabljen dodatek za preprečevanje lipidne peroksidacije v prehrani in kot konzervans za zaščito živil (Rudan-Tasič, 2000).

Živali iz skupine ECSe so imele statistično značilno nižjo vsebnost MDA v krvni plazmi, kot živali iz kontrolne skupine. Podobno kot pri vsebnosti vitamina E, ima na znižanje vsebnosti MDA v krvni plazmi največji vpliv koncentracija vitamina E v krmi, saj med skupinama ECSe in E ni bilo statistično značilnih razlik. Dodatek vitamina C in selena nista vplivala na vsebnost MDA v krvni plazmi. Nasprotno so Sahin in sod. (2003) ugotovili, da dodatek vitamina C (250 mg/kg) zniža vsebnost MDA v serumu pri prepelicah. Vpliv selena na kazalec lipidne oksidacije v eritrocitih (TBARS) so pri pitovnih piščancih preučevali Rao in sod. (2013). Piščancem so dodajali različne koncentracije selena (0, 100, 200, 300 in 400 µg/kg krme). Ugotovili so, da se s povečevanjem koncentracije selena v krmi, kazalec lipidne oksidacije postopno zmanjšuje v eritrocitih in s tem lipidna peroksidacija. Prav tako kot dodatek vitamina C in selena, tudi dodatek Farmatana BCO ni vplival na znižanje vsebnosti MDA v krvni plazmi. To potrjuje rezultate, ki jih navajajo Voljč in sod. (2013), ki prav tako niso ugotovili znižanja vsebnosti MDA ob dodatku Farmatana BCO v krmo pitovnih piščancev. Eden od možnih vzrokov, da posamezni dodatki, razen vitamin E, niso vplivali na znižanje vsebnosti MDA v krvni plazmi je, da kljub dodatku 5 % lanenega olja nismo izpostavili piščancev povisankemu oksidativnemu stresu, saj smo v krmo kontrolne skupine, po normativih Ross 308 Broiler Nutrition specifications (2014), dodali 50 mg vitamina E, kar je bistveno višja vsebnost kot po priporočilih NRC (1994), ki je 10 IU. Primerjava vsebnosti MDA v krvni plazmi kontrolne skupine v naši raziskavi (0,44 nmol/ml) z vsebnostjo MDA (0,65 nmol/ml) v plazmi piščancev v kontrolni skupini pri raziskavi Voljč (2012) kaže na nižji oksidativni stres v naši raziskavi, kar je posledica vsebnosti vitamina E v krmi kontrolne skupine v naši raziskavi (51,2 mg/kg) v primerjavi z vsebnostjo vitamina E v kontrolni skupini (8,0 mg/kg) raziskave Voljč (2012). Vsebnost vitamina E v krmi kontrolne skupine v naši raziskavi je primerljiva z vsebnostjo v skupini E-DL85 (60,7 mg/kg) v raziskavi Voljč (2012), kjer je bila vsebnost MDA v plazmi piščance iz te skupine 0,43 nmol/ml, kar je primerljivo z rezultati naše kontrolne skupine. Rezultati kažejo na to, da dodatek

vitamina C, selena ali Farmatana BCO v krmo, obogateno z lanenim oljem, ki vsebuje vitamin E po normativih Ross 308 Broiler Nutrition specifications (2014), ni potreben, saj dodatno ne ščiti piščancev pred oksidativnim stresom.

Pri merjenju ACL smo ugotovili, da dodatek vitamina E, selena, kombinacije dodatkov in Farmatana BCO, niso vplivale na ACL. Dodatek vitamina C je statistično značilno povečal ACL. Noben dodatek in njihova kombinacija, ni statistično značilno vplival na ACW. Smo pa pri ACW izmerili statistično značilno razliko med skupino C in Fa.

Merjenje antioksidativne kapacitete z aparatom Photochem je še dokaj neraziskano. Tomažin in sod. (2012) so merili vpliv dodatka vitamina E na ACL pri pitovnih piščancih. Ugotovili so, da dodatek vitamina E poveča ACL. Enake rezultate, glede vpliva vitamina E na ACL, so dobili Voljč in sod. (2013), ko so spremljali vpliv vitamina E in tanina na ACL pri pitovnih piščancih. Dodatek Farmatana BCO na koncentracijo ACL ni imel vpliva. Mikulski in sod. (2009) so preučevali vpliv selena na ACL in ACW pri puranih. Dodatek selena ni vplival na ACL in ACW. Kot vir polifenolov, so Jankowski in sod. (2016) puranom v krmo vključili tropine različnega sadja. Zanimalo jih je ali različni polifenoli dodani v krmo, vplivajo na ACL in ACW. Ugotovili so, da tropine črnega ribeza niso vplivale na ACL in ACW, jabolčne tropine so povečale ACL in ACW, jagodne tropine pa so povečale ACL, na ACW pa niso imele vpliva. Ker je metoda merjenja antioksidativne kapacitete z aparatom Photochem še dokaj neraziskana in zato, ker so si nekateri rezultati glede vplivov različnih dodatkov na ACL in ACW nasprotujejo, bi bilo potrebno narediti še dodatne raziskave glede vpliva različnih antioksidantov na ACL in ACW.

Na podlagi dobljenih rezultatov, smo potrdili hipotezo, da dodatek vitamina E v krmo, zviša vsebnost vitamina E v krvni plazmi in zmanjša lipidno peroksidacijo, povzročeno s povečanim zauživanjem VNMK. Pri ostalih posameznih dodatkih smo hipotezo ovrgli. Prav tako smo ovrgli hipotezo, da so kombinacije dodanih antioksidantov pri zmanjševanju oksidativnega stresa bolj učinkovite, kot vsak posamezni dodatek, saj med skupinama ECSe in E nismo zaznali statistično značilnih razlik.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- dodatek posameznih antioksidantov ni vplival na proizvodne lastnosti piščancev, kombinacija antioksidantov (vitamina E in C ter Se) je poslabšala proizvodne lastnosti pitovnih piščancev,
- dodatka vitamina E in kombinacije dodanih antioksidantov (vitamina E in C ter Se) sta zvišala vsebnost α -tokoferola ter znižala vsebnost γ -tokoferola in MDA v krvni plazmi,
- dodatki vitamina C, selena ali Farmatana BCO niso imeli vpliva na vsebnost vitaminov E in C in MDA v krvni plazmi,
- dodatki vitamina E, selena in kombinacije antioksidantov ter Farmatana BCO v krmo za pitovne piščance, niso vplivali na koncentracijo ACL in ACW v serumu,
- dodatek vitamina C je zvišal ACL, na ACW pa ni imel vpliva,
- če krma že vsebuje priporočene količine vitamina E in selena, dodajanje vitamina C, Farmatana BCO ali dodatnega selena ni potrebno, kljub višji oksidativni obremenitvi zaradi dodatka 5 % lanenega olja; v takih razmerah je za zmanjšanje oksidativnega stresa učinkovito le povečanje količine vitamina E v krmi.

6 POVZETEK

V raziskavi smo preučevali vpliv dodatkov vitamina E, vitamina C, selena in možno sinergijo med njimi ter Farmatana BCO, na proizvodne lastnosti in parametre zdravja pitovnih piščancev, v povezavi z oksidativnim stresom. Oksidativni stres smo izvali z dodatkom 5 % hladno stiskanega lanenega olja v krmo piščancev.

V poskus, ki je trajal 40 dni, smo vključili 600 dan starih petelinčkov provenience ross 308. Piščance smo razdelili v 6 skupin (5 ponovitev znotraj skupine). Krmljeni so bili po volji. Prvih 20 dni so bili krmljeni z enako krmno mešanico, šarter-jem oz. grover-jem, potem pa so bili krmljeni z krmno mešanico finišer, kateri je bilo dodano laneno olje in različni dodatki odvisno od poskusne skupine: kontrolna skupina K (brez dodatka), skupina E (200 IU vitamina E/kg), skupina C (250 mg vitamina C/kg), skupina Se (0,2 mg selena/kg), skupina ECSe (200 IU vitamina E/kg, 250 mg vitamina C/kg in 0,20 mg selena/kg) in skupina Fa (500 mg Farmatana BCO/kg). Tedensko smo tehtali piščance in ostanke krme. Spremljali smo telesno maso, prirast, zauživanje in izkoriščanje krme. Na koncu poskusa smo 12 piščancev na skupino žrtvovali in jim odvzeli vzorce krvi za analize vsebnosti vitamina E, vitamina C, MDA, ACL in ACW.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da dodatek kombinacije vitamina E, vitamina C in selena, zmanjša zauživanje krme. Manjše zauživanje krme se je odražalo tudi v manjši masi piščancev in slabšem prirastu. Posamezni dodatki niso vplivali na proizvodne rezultate piščancev. Vpliv na vsebnost α -tokoferola in γ -tokoferola smo opazili le pri piščancih, ki smo jih v krmo dodali vitamin E, posamezno ali v kombinaciji z drugimi dodatki. Dodatek vitamina E je zvišal vsebnost α -tokoferola in znižal vsebnost γ -tokoferola. Ostali dodatki na vsebnost α -tokoferola in γ -tokoferola niso vplivali. Na vsebnost vitamina C ni vplival noben dodatek. Pri oceni parametrov zdravja piščancev smo ugotovili, da dodatek vitamina E in kombinacija vitamina E, vitamina C in selena, statistično značilno znižata vsebnost MDA v krvni plazmi. Na statistično značilno znižanje vsebnosti MDA v krvni plazmi, ob dodatku kombinacije antioksidantov, vpliva predvsem dodatek vitamina E, saj med skupinama ECSe in E nismo zaznali statistično značilnih razlik. Pri analizi ACL in ACW smo ugotovili, da dodatek vitamina C poveča ACL. Ostali dodatki na ACL niso imeli vpliva. Na ACW ni vplival noben dodatek.

V raziskavi smo potrdili, da dodatek vitamina E v krmo zviša vsebnost vitamina E v krvni plazmi in hkrati zniža vsebnost MDA v krvni plazmi. To pomeni, da uspešno preprečuje lipidno peroksidacijo ter tako ščiti organizem pred negativnimi vplivi oksidativnega stresa, ki je posledica visoke vsebnosti VNMK v krmi. Ostali dodatki na zmanjševanje oksidativnega stresa piščancev niso imeli vpliva. Kombinacija dodatkov ECSe je imela glede zmanjševanja oksidativnega stresa piščancev primerljiv učinek kot dodatek samega vitamina E in tako ni imela sinergističnega učinka, je pa poslabšala proizvodne lastnosti

piščancev, zato bi bilo potrebno narediti dodatne raziskave glede vpliva kombinacije antioksidantov na proizvodne lastnosti pitovnih piščancev.

7 VIRI

- Abidi S. L., Mounts T. L. 1997. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 782, 1: 25-32
- Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., Aguilar C. N. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 2: 189-199
- Altan O., Pabuccuoglu A., Altan A., Konyalioglu S., Bayraktar H. 2003. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science*, 44, 4: 545-550
- Bird R. P., Draper H. H. 1984. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105: 299-304
- Chirico S. 1994. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in Enzymology*, 233: 314-318
- Chen G., Wu J., Li C. 2014. Effect of different selenium sources on production performance and biochemical parameters of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 4: 747-754
- Choct M., Naylor A. J. 2004. The effect of dietary selenium source and vitamin E levels on performance of male broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 7: 1000-1006
- Chung K. T., Wong T. Y., Wei C. I., Huang Y. W., Lin Y. 1998. Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 6: 421-464
- Cinar M., Yildirim E., Yigit A. A., Yalcinkaya I., Duru O., Kisa U., Atmaca N. 2014. Effects of dietary supplementation with vitamin C and vitamin E and their combination on growth performance, some biochemical parameters, and oxidative stress induced by copper toxicity in broilers. *Biological Trace Element Research*, 158, 2: 186-196
- Combs G. F., Combs S. B. 1984. The nutritional biochemistry of selenium. *Annual Review of Nutrition*, 4: 257-280
- Davey M. W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I. J. J., Strain J. J., Favell D., Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7: 825-860

Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science & Technology, 17, 9: 505-512

Dvorska J., Surai P. 2006. Recent advances in selenium nutrition of chicken. V: Zbornik predavanj 15. posvetovanja o prehrani domačih živali »Zadrvčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 9-10 nov. 2006. Kapun S., Čeh T. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota: 237-244

Eitenmiller R., Lee J. 2004. Vitamin E: Food chemistry, composition and analysis. New York, Marcel Dekker: 505 str.

Englmaierova M., Bubancova I., Vit T., Skrivan M. 2011. The effect of lycopene and vitamin E on growth performance, quality and oxidative stability of chicken leg meat. Czech Journal of Animal Science, 56, 12: 536-543

Engberg R. M., Lauridsen C., Jensen S. K., Jakobsen K. 1996. Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets; Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. Poultry Science, 75, 8: 1003-1011

Esterbauer H., Cheeseman K. H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186: 407-421

Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology & Medicine, 11, 1: 81-128

Fellenberg M. A., Speisky H. 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. World's Poultry Science Journal, 62, 1: 53-70

Frankič T. 2009. Vpliv nekaterih rastlinskih ekstraktov na oksidacijski status pri rastročih prašičih. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 98 str.

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 »Zadrvčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8-9 nov. 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota: 27-40

Fukunaga K., Takama K., Suzuki T. 1995. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. Analytical Biochemistry, 230, 1: 20-23

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, 2: 318-327

Georgieva N. V., Koinarski V., Gadjeva V. 2006. Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *The Veterinary Journal*, 172, 3: 488-492

Ghazi S., Amjadian T., Norouzi S. 2015. Single and combined effects of vitamin C and oregano essential oil in diet, on growth performance, and blood parameters of broiler chicks reared under heat stress condition. *International Journal of Biometeorology*, 59, 8: 1019-1024

Gružauskas R., Barstys T., Racevičiute-Stupeliene A., Kliševičiute V., Buckuniene V., Bliznikas S. 2014. The effect of sodium selenite, selenium methionine and vitamin E on productivity, digestive processes and physiologic condition of broiler chickens. *Veterinarija ir Zootechnika*, 65, 87: 22-29

Guo Y., Qing T., 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 Tehnology*, 89, 3-4: 165-173

Harsini G. S., Habibian M., Moeini M. M., Abdolmohammadi A. R. 2012. Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biological Trace Element Research*, 148, 3: 322-330

Hassan I. A. G., Elzubeir E. A., El Tinay A. H. 2003. Growth and apparent absorption of minerals in broiler chicks fed diets with low or high tannin contents. *Tropical Animal Health and Production*, 35, 2: 189-196

Iji P. A., Khumalo K., Slippers S., Gous R. M. 2004. Intestinal function and body growth of broiler chickens on maize-based diets supplemented with mimosa tannins and microbial enzyme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 12: 1451-1458

Ipek A., Canbolat O., Karabulut A. 2007. The effect of vitamin E and vitamin C on the performance of Japanese quails (*Coturnix Coturnix Japonica*) reared under heat stress during growth and egg production period. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20, 2: 252-256

Jacob R. A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15, 5: 755-766

Jankowski J., Juskiewicz J., Zdunczyk P., Kosmala M., Zielinski H., Antoszkiewicz Z., Zdunczyk Z. 2016. Antioxidant status of blood and liver of turkeys fed diets enriched

- with polyunsaturated fatty acids and fruit pomaces as a source of polyphenols. Polish Journal of Veterinary Sciences, 19, 1: 89-98
- Jansman A. J. M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. Nutrition Research Reviews, 6, 1: 209-236
- Ješe Janežič V. 2001. Koncentracija malondialdehida v krvni plazmi in seču kot indikator peroksidacije lipidov v prehranskih raziskavah. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Jiang Q., Christen S., Shigenaga M. K., Ames B. N. 2001. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. The American Journal of Clinical Nutrition, 74, 6: 714-722
- Koinarski V., Georgieva N., Gadjeva V., Petkov P. 2005. Antioxidant status of broiler chickens, infected with *Eimeria acervulina*. Revue de Medecine Veterinaire, 156, 10: 498-502
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi '00, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi '00, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37
- 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, 1: 9-22
- Lohakare J. D., Ryu M. H., Hahn T. W., Lee J. K., Chae B. J. 2005. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. Journal of Applied Poultry Research, 14, 1: 10-19
- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. The Veterinary Journal, 173, 3: 502-511
- Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K. 1996. Food antioxidants. New York, Marcel Dekker: 490 str.

Mangan J. L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutrition Research Reviews, 1, 1: 209-231

Mansoub N. H., Chekani-Azar S., Mizban S., Hamadani M., Ahadi F., Lotfi A. 2010. Influence of replacing inorganic by organic selenium source in ration on performance and carcass characteristics of male broilers. Global Veterinaria, 4, 4: 317-321

Mikulski D., Jankowski J., Zdunczyk Z., Wroblewska M., Sartowska K., Majewska T. 2009. The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism, and meat quality of turkeys. Journal of Animal and Feed Sciences, 18, 3: 518-530

Mueller-Harvey I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86, 13: 2010-2037

Mukai K., Mitani S., Ohara K., Nagaoka S. I. 2005. Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. Free Radical Biology and Medicine, 38, 9: 1243-1256

Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Goton N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. American Journal of Clinical Nutrition, 62, 6: 1322S-1326S

Niu Z. Y., Liu F. Z., Yan Q. L., Li W. C. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. Poultry Science, 88, 10: 2101-2107

NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. 1994. 9th revised edition. Washington, National Academy Press: 157 str.
[http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994\[1\].pdf](http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994[1].pdf) (9. jun. 2016)

Ozkan S., Malayoglu H. B., Yalcin S., Karadas F., Kocturk S., Cabuk M., Oktay G., Ozdemir S., Ozdemir E., Ergul M. 2007. Dietary vitamin E (α -tocopherol acetate) and selenium supplementation from different sources: performance, ascites-related variables and antioxidant status in broilers reared at low and optimum temperatures. British Poultry Science, 48, 5: 580-593

Papas A. M. 1999. Determinants of antioxidative status in humans. V: Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Papas A.M. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 21-36

Popov I. N., Lewin G. 1996. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. IV. Testing of lipid-soluble antioxidants. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 31, 1-2: 1-8

- Popov I., Lewin G. 1999. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and amino acids during in vitro oxidation. *Luminescence*, 14, 3: 169-174
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10: 4290-4302
- Rao S. V. R., Prakash B., Raju M. V. L. N., Panda A. K., Poonam S., Murthy O. K. 2013. Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26, 2: 247-252
- Rezar V., Salobir J. 2014. Effects of tannin-rich sweet chestnut (*Castanea sativa* mill.) wood extract supplementation on nutrient utilisation and excreta dry matter content in broiler chickens. *European Poultry Science*, 78: 1-10
- Ross 308 Broiler Nutrition specifications. 2014. Aviagen: 10 str.
http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross308BroilerNutritionSpecs_2014-EN.pdf (9. jun. 2016)
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi '00, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-51
- Ruperez F. J., Martin D., Herrera E., Barbas C. 2001. Chromatographic analysis of alphatocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935, 1-2: 45-69
- 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, 2: 244-249
- Sahin K., Sahin N., Onderci M., Yaralioglu S., Kucuk O. 2001. Protective role of supplemental vitamin E on lipid peroxidation, vitamins E, A, and some mineral concentrations of broilers reared under heat stress. *Veterinary Medicine - Czech*, 46, 5: 140-144
- Sahin K., Sahin N., Yaralioglu S. 2002. Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biological Trace Element Research*, 85, 1: 35-45

- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih - vpliv na zdravje. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi '00, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Skrivan M., Marounek M., Englmaierova M., Skrivanova E. 2012. Influence of dietary vitamin C and selenium, alone and in combination, on the composition and oxidative stability of meat of broilers. *Food Chemistry*, 130, 3: 660-664
- Surai P. F. 2002. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *World's Poultry Science Journal*, 58, 3: 333-347
- Tavarez M. A., Boler D. D., Bess K. N., Zhao J., Yan F., Dilger A. C., McKeith F. K., Killefer J. 2011. Effects of antioxidant inclusion and oil quality on broiler performance, meat quality, and lipid oxidation. *Poultry Science*, 90, 4: 922-930
- Tawfeek S. S., Hassanin K. M. A., Youssef I. M. I. 2014. The effect of dietary supplementation of some antioxidants on performance, oxidative stress, and blood parameters in broilers under natural summer conditions. *Journal of World's Poultry Research*, 4, 1: 10-19
- Templar J., Kon S. P., Milligan T. P., Newman D. J., Raftery M. J. 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14, 4: 946-951
- Tomažin U., Frankič T., Levart A., Talbot R., Horvat S., Salobir J. 2012. Vloga nekaterih izomer vitamina E pri oksidacijskem stresu in njihov vpliv na ekspresijo genov. V: Zbornik predavanj 21. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali »Zadravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8-9 nov. 2012. Kapun S., Čeh T. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota: 91-97
- Upton J. R., Edens F. W., Ferker P. R. 2008. Selenium yeast effect on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 7, 8: 798-805
- 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, 1: 44-84
- Vathana S., Kreosna K., Loan C. P., Thinggaard G., Kabasa J. D., Meulen U. 2002. Effect of Vitamin C supplementation on performance of broiler chickens in Cambodia. V: Challenges to organic farming and sustainable land use in the tropics and subtropics. Book of abstracts. Deutscher Tropentag, Witzenhausen, 9-11. okt. 2002. Deininger A. (ur.). Witzenhausen, University of Kassel, University Press: 156

- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemeč M., Salobir J. 2011. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of α -tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress *in vivo* and the oxidative stability of meat. *Poultry Science*, 90, 7: 1478-1488
- Voljč M., Levart A., Žgur S., Salobir J. 2013. The effect of α -tocopherol, sweet chestnut wood extract and their combination on oxidative stress *in vivo* and the oxidative stability of meat in broilers. *British Poultry Science*, 54, 1: 144-156
- Voljč M. 2012. Vpliv kostanjevega tanina, RRR- α in *all-rac- α* -tokoferola na zmanjšanje oksidacijskega stresa prašičev in izboljšanje oksidacijske stabilnosti njihovega mesa. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 86 str.
- Wall R., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. 2010. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68, 5: 280-289
- Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.
- Wechtersbach L., Cigič B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 5: 767-772
- Whitehead C. C., Keller T. 2003. An update on ascorbic acid in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 59, 2: 161-184
- Wong S. H. Y., Knight J. A., Hopfer S. M., Zaharia O., Leach C. N., Sunderman F. W. J. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33, 2: 214-220
- Zhang W., Xiao S., Lee E. J., Ahn D. U. 2011. Consumption of oxidized oil increases oxidative stress in broilers and affects the quality of breast meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3: 969-974

ZAHVALA

Na tem mestu se zahvaljujem:

- mentorici doc. dr. Vidi Rezar in somentorici asist. dr. Alenki Levart za vse koristne nasvete, strokovno pomoč in spodbudo pri delu,
- recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju in doc. dr. Silvestru Žgurju za strokovni pregled naloge,
- go. Jerneji Bogataj za tehnični pregled naloge,
- tehničnemu sodelavcu Marku Kodri in dr. Tini Trebušak za pomoč pri laboratorijskem delu,
- go. Sabini Knehtl za vse nasvete in spodbudne besede tekom celotnega študija,
- staršem in bratu Boštjanu, ki so mi vedno stali ob strani in me spodbujali,
- vsem ostalim, ki so kakorkoli pomagali pri izdelavi naloge.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Primož OGOREVC

**VPLIV DODATKA SELENA, VITAMINOV E IN C
TER RASTLINSKIH POLIFENOLOV NA
OKSIDATIVNI STATUS PITOVNIH PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016