

# Diferencijalna krvna slika u kokoši teške pasmine hranjene uz dodatak prirodnog 1,25(OH)2D3-glikozida

---

Lošić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:932160>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Ivan Lošić

Diferencijalna krvna slika u kokoši teške pasmine hranjene uz dodatak prirodnog  
1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

NAZIV ZAVODA/ KLINIKE:

Zavod za fiziologiju i radiologiju, Zavod za bolesti peradi s klinikom na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

PREDSTOJNIK:

Prof. dr. sc. Marinko Vilić, izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

MENTORI:

Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Doc. dr. sc. Lana Pađen

ČLANOVI POVJERENSTVA:

1. Prof. dr. sc. Jasna Aladrović
2. Doc. dr. sc. Lana Pađen
3. Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
4. Prof. dr. sc. Marinko Vilić (zamjena)

## ZAHVALE

*Zahvaljujem se svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu na pomoći, strpljenju, izrazitoj suradnji te razumijevanju prilikom izrade diplomskog rada.*

*Zahvalan sam doc. dr. sc Lani Pađen te prof. dr. sc. Jasni Aladrović na ukazanom povjerenju i usmjeravanju tijekom pisanja ovoga rada.*

*Želim se zahvaliti svim kolegama i prijateljima koje su mi omogućili ovo nevjerojatno iskustvo i koji su bili uz mene. Posebna zahvala Sunčici Sertić, dr.med.vet., što mi je pomogla u otkrivanju životnog usmjerenja te na nevjerojatoj požrtvovnosti da mi omogući učenje i razvijanje u daljnjoj karijeri.*

*Ponajviše se zahvaljujem svojoj obitelji koji su bili uz mene tijekom velikih uspona, ali i padova. Ništa od ovoga ne bi bilo moguće bez vas.*

## POPIS TABLICA I SLIKA

### **Slika 1.**

Broj heterofila (H) i limfocita (L) u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja (srednja vrijednost  $\pm$  SD).

### **Slika 2.**

Broj eozinofila (E), bazofila (B) i monocita (M) u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja (srednja vrijednost  $\pm$  SD  $\times 10^9/\text{L}$ ).

### **Slika 3.**

Omjer heterofila i limfocita u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja.

### **Tablica 1.**

Udio leukocita u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja. (%)

### **Tablica 2.**

Koncentracija kalcija, fosfora i magnezija (srednja vrijednost  $\pm$  SD; mmol/L) u serumu kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14. i 35. dana od početka dodavanja.

## POPIS KRATICA

Ca (lat. *calcium*) - kalcij

Mg (lat. *magnesium*) - magnezij

P (lat. *phosphorus*) - fosfor

Tj. - to jest

TRH (eng. *thyrotropin-releasing hormone*) - tireotropin oslobađajući hormon

GnRH (eng. *gonadotrophin-releasing hormone*) - godanotropin oslobađajući hormon

CRH (eng. *corticotrophin-releasing hormone*) - kortikotropin oslobađavajući hormon

GHRH (eng. *growth-hormone-releasing hormone*) - somatotropin oslobađajući hormon

LH (eng. *luteinizing hormone*) - luteinizacijski hormon

FSH (eng. *follicle-stimulating hormone*) - folikulostimulacijski hormon

ACTH (eng. *adrenocorticotropic hormone*) - adrenokortikotropni hormoni

PTH (eng. *parathyroid hormone*) - paratireoidni hormon

T  $\frac{1}{2}$  - vrijednost poluživota aktivnosti hormona

T max - maksimalna vrijednost aktivnosti hormona

GUK – koncentracija glukoze u krvi

H/L omjer - omjer heterofila i limfocita

IL - 10 (eng. *interleukins*) - interleukini

HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (eng. *hydrogen phosphate*) - hidrogen fosfat

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (eng. *dihydrogen phosphate*) - dihidrogen fosfat

ATP (eng. *adenosin triphosphate*) - adenzin trifosfat

cAMP (eng. *cyclic adenosin monophosphate*) - ciklički adenzin monofosfat

SG (lat. *Solanum glaucophyllum*)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	3
2.1. PROIZVODNI CIKLUS MATIČNOG JATA PASMINA ROSS 308.....	3
2.2. STRES – HORMONALNA I STANIČNA OSNOVA.....	5
2.3. ULOGA I HORMONSKA REGULACIJA VITAMINA D.....	9
2.4. METABOLIZAM KALCIJA, FOSFORA I MAGNEZIJA .....	10
3. MATERIJAL I METODE .....	14
3.1. UZORCI.....	14
3.2. ANALIZE .....	14
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	15
4. REZULTATI.....	16
5. RASPRAVA .....	20
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. LITERATURA .....	23
8. SAŽETAK .....	27
9. SUMMARY.....	28
10. ŽIVOTOPIS.....	29

## 1. UVOD

Domaća kokoš vodi porijeklo s područja Jugoistočne Azije, gdje arheološki podaci upućuju na domestikaciju koja se odvila prije 3 000 – 3500 godina, u svrhu religioznih i ritualnih razloga te kasnije korištenje domaće kokoši kao kućnog ljubimca (KRALIK i sur., 2008.). Tijekom razvoja trgovačkih puteva iz Azije, kokoš je prenesena u Europu oko 8. stoljeća prije Krista. Krajem 19. stoljeća počinje intenzivni rast afiniteta za genetikom kokoši i križanjem različitih pasmina te uzgoj novih hibrida radi boljeg postizanja proizvodnih osobina (SENČIĆ, 2011.).

U današnjoj intenzivnoj peradarskoj proizvodnji tova i proizvodnja konzumnih jaja dvije su glavne proizvodne niše. Za tova se koriste teške pasmine, dok za proizvodnju konzumnih jaja tu ulogu imaju lake pasmine kokoši. Hibridne kokoši nesilice i tovnih pilića ili takozvani linijski hibridi osnovica su suvremene intenzivne proizvodnje kokošjih jaja i mesa brojlera. Najčešće se koriste četverolinijski hibridi koji nastaju parenjem čistih linija. Pod pojmom "ČISTE LINIJE" smatraju se potomci jednog mužjaka istaknutih proizvodnih i eksterijernih osobina koje se prenose na potomstvo (KRALIK i sur., 2008.). Poželjne su osobine poput bržeg rasta, ranijeg spolnog sazrijevanja, boljeg iskorištavanja hrane, povećanja nesivosti te količina jaja. Križanjem čistih linija dobiva se djedovska generacija koja služi za proizvodnju rasplodnih jaja roditeljske generacije, dok se roditelji koriste za proizvodnju rasplodnih jaja krajnjeg proizvoda križanja, tovnih pilića (JOŽEF i sur., 1995.). Pasma Ross 308 koristi se isključivo za tova (SENČIĆ, 2011.).

Za uspješnost intenzivne proizvodnje konzumnih i rasplodnih jaja uz genetsku predispoziciju za proizvodnju, važan čimbenik je i hranidba peradi. Uz navedeno, za uspješnu proizvodnju potrebno je osigurati pravilne uvjete držanja, u što se ubrajaju dimenzija i oprema nastambe te temperatura, relativna vlažnost, kvaliteta zraka i osvjetljenje nastambe (HPA, 2009.). Nebalansirana hranidba, pogotovo manjka kalcija (Ca) i fosfora (P), uzrokuje velike gubitke u peradarskoj proizvodnji u vidu smanjene nesivosti te smanjene kvalitete ljuske jaja. Aktivni metabolit vitamina D ima ulogu u reguliranju homeostaze kalcija i fosfora u organizmu kao i važnu ulogu u pravilnom razvoju i funkciji tkiva. Smatra se da kod peradi aktivni metabolit vitamina D ima jaki imunomodulacijski, protuupalni i antioksidativni učinak te izrazito veliki utjecaja na ukupni broj i odnos bijelih krvnih stanica (MATTILA i sur., 2003.). U intenzivnoj proizvodnji osobito je važno pravodobno praćenje zdravlja peradi, pri čemu su biokemijske te hematološke pretrage od iznimnog značaja.



Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida biljnog podrijetla u hranu teške linije nesilica Ross 308 na ukupni broj i populaciju bijelih krvnih stanica te koncentraciju kalcija (Ca), fosfora (P) i magnezija (Mg) u krvi.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. PROIZVODNI CIKLUS MATIČNOG JATA PASMINA ROSS 308

Pasmine kokoši možemo podijeliti u pet skupina: ukrasne pasmine, pasmine za borbu, teške pasmine, lake te kombinirane pasmine. Za proizvodnju konzumnih jaja koriste se pasmine lakih nesilica. Svoje podrijetlo vuku s područja Mediterana. Glavne odlike lakih pasmina nesilica su visoka proizvodnja te relativno mala tjelesna masa uz lagane kosti. Dodatno su karakterizirane velikom krijestom i podbradnjakom, živahnim temperamentom te mesom slabije kvalitete (SENČIĆ, 2011.). Lake pasmine nesilica teže podnose niže temperature okoliša, rano-zrele su u dobi od 4 do 5 mjeseci te imaju veliki nagon za sjedenje na jajima. Nesivost ovih pasmina kreće se i preko 300 jaja godišnje. Tjelesna masa pijetlova je u prosjeku 3,5 kg, dok se tjelesna masa ženki kreće u rasponu od 1,8 do 2 kg. Kada se lake pasmine drže radi proizvodnje konzumnih jaja, tada se uzgajaju samo ženke, jer za navedenu proizvodnju jaja ne smiju biti oplodena. Najznačajniji predstavnici lakih pasmina su: Leghorn, Minorca, Talijanska, Hamburška te Andaluzijska kokoš. Zajednička fenotipska oznaka ove skupine su bijeli podušnjaci na glavi (SENČIĆ, 2011.). Teške pasmine kokoši svoje podrijetlo vuku iz Azije. Tjelesna masa koka u prosjeku iznosi 4,5 kg dok pijetlovi dostižu prosječno 8 kg tjelesne mase. Teške pasmine bolje podnose niše temperature okoliša, čemu pridonosi njihovo rastresito perje, flegmatičnost, a podbradnjak i krijesta su slabo izraženi. Godišnje nesivost iznosi 100 – 120 jaja. Ženke počinju nesti s osam mjeseci starosti. Teške pasmine kokoši imaju veliki udio kostura u tijelu i malo mesa slabije kakvoće. Navedene su pasmine značajne jer su korištene u stvaranju pasmina za proizvodnju mesa i kombiniranih pasmina kokoši. Najpoznatije predstavnici teške pasmine su: Langshan, Brahma, Cochinchina.

Na kombinirane pasmine, teške pasmine su prenijele oblik tijela, boju perja te tjelesnu težinu dok su lake pasmine prenijele veću nesivost (KRALIK i sur., 2011.). Kombinirane pasmine kokoši obuhvaćaju najveći broj pasmina kokoši na svijetu. Odlikuju ih dobra proizvodnja jaja i mesa, rano-zrelost u vremenu od 4. mjeseca starosti te godišnja nesivost od 140 – 180 jaja. Kombinirane pasmine karakteriziraju slabo izražen podbradnjak i krijesta, uz tjelesnu masu koka u prosjeku od 3 kg te pijetlova u prosjeku od 3,5 kg. Najtipičniji predstavnici ove skupine kokoši su: Rhode Island Reds, New Hampshire, Plymouth Rocks, Australorp, Ferol, Cornish, Hudan, Sussex. Na našem teritoriju u predstavnike kombiniranih pasmina ubrajamo Hrvaticu, Štajersku kokoš i Golovratku. Najčešći teški hibridi kokoši koji se uzgajaju na našim prostorima su: Ross, Cobb i Hubbard (SENČIĆ, 2011.).

Prilikom formiranja matičnog jata teške pasmine Ross 308, obvezno je dobiti optimalnu težinu kod oba spola u svakoj produktivni fazi radi postizanja najboljih rezultata. U različitim fazama rasta, razvijaju se različita tkiva i organi, zbog čega je važna pravilna prehrana za postizanje optimalne težine jedinki. Današnji uzgoj matičnih jata temelji se na preporuci da se muške i ženske jedinke uzgajaju odvojeno, sve do 21. - 24. tjedna kada postižu spolnu zrelost (ANONYMOUS, 2018.). Prva produktivna faza nesilica traje od 0. do 105. dana starosti, a započinje dolaskom pilića na farmu. Prije samog dolaska pilića na farmu, objekt u kojem će biti smješteni mora se temeljito očistiti, dezinficirati poštujući princip sve unutra, sve van te imati pravilne mikroklimatske uvijete poput temperature zraka i poda (30 °C), relativne vlage (60-70%), dubine stelje, distribucije vode i hrane te svjetlosni režim. Tijekom perioda nakon 28 dana, dolazi do intenzivnog razvoja imunološkog, krvožilnog, probavnog i koštanog sustava.

U opisanom razdoblju moraju se svakodnevno kontrolirati mikroklimatski uvjeti na farmi, ali i samo ponašanje jedinki koji mogu ukazivati na različite nepoželjne promjene mikroklimatskih uvjeta. Najznačajniji primjer je previsoka ili preniska temperatura okruženja koja se može vidjeti prema raspodjeli pilića oko toplinskog izvora. Pilići koji se kreću dalje od izvora topline, ukazuje na povećanu temperaturu, dok pilići koji se skupljaju u hrpama uz izvore topline, ukazuje na prenisku temperaturu u prostoru (ANONYMOUS, 2018.). Nakon 28. dana starosti, preporučuje se kokošima ugraditi prečke kako bi se potaknuo nagon za nesenje. Tijekom čitavog uzgoja i proizvodnje, oba spola moraju proći mjerenje tjelesne mase, radi utvrđivanja koeficijenta varijacije (CV%) i uniformnosti. Koeficijent varijacije predstavlja vrijednost varijacije tjelesne težine unutar jata te se poželjnom vrijednosti smatra oko 8. Uniformnost je vrijednost koja predstavlja ujednačenost tjelesne težine unutar jata te se prikazuje kao postotak. Idealni postotak uniformnosti tjelesne težine jata iznosi iznad 80% (ANONYMOUS, 2018.).

Nakon mjerenja, populacija jata razdjeljuje se na tri kategorije: "laka populacija", koja predstavlja skupinu jedinki kojima je masa ispod optimalnih vrijednosti i to za 100g ili više; "prosječna populacija", čija je vrijednost u optimalnim rasponima mase za dob te "teška populacija", čija je vrijednost tjelesne mase iznad 100g od optimalnih raspona. Vrijednosti tjelesne mase "lake" i "teške" populacije, pomoću određenih metoda, usmjeravamo prema optimalnoj težini do 105. dana. "Laka populacija" korigira se s mjerama u kojima se duži vremenski period koristi starter smjesa koja je nutritivno bogatija. Preporuke za postupanje s "teškom populacijom" odnose se na reduciranje ili potpuno ukidanje povećanja hranjenja u toj fazi razvoja. Navedenu fazu rasta karakterizira rapidni rast krvožilnog, imunološkog i

probavnog sustava te 90% razvitka skeletnog sustava završava upravo u periodu 80. - 95. dana života (ANONYMOUS, 2018.). Ulaskom u drugu fazu proizvodnje, takozvane "pripreme nesilica za nesivost", tjedni monitoring tjelesne mase kao i fotostimulacija budućih nesilica bitni su za ulazak u period spolne zrelosti. U ovom razdoblju uočava se i razvitak sekundarnih spolnih obilježja, poput razvitka zdjelice te dobitka boje krijeste i podbradnjaka.

Preporuke za početak navedene faze "faze spolne zrelosti" su: selidba u prostore namijenjene nesilicama, smanjenje gustoće naseljenosti, povećanje hranidbenog prostora te dodavanje dodatne opreme poput gnijezda (ANONYMOUS, 2018.). Osmosatni svjetlosni režim preporučuje se prije fotostimulacije koja nastupa oko 140. dana starosti nesilica. Svjetlosni režim postupno se kroz fotostimulaciju produžuje na period od 11 do 14 sati (LEWIS i sur., 2010.). Formiranje harema započinje postizanjem spolne zrelosti koja je u periodu 7 ili 14 dana nakon uvođenja fotostimulacije. Početni omjer mužjaka i ženki je 1:12 te se na tjednoj bazi korigira ovisno o različitim čimbenicima. Važnost sekundarnih spolnih i drugih anatomskih obilježja očituje se u raspoznavanju spolova. Osnovne karakteristike koje se promatraju za raspoznavanje spolova su: izgled i veličina krijeste te podbradnjaka, debljina skočnog zgloba, oblik tijela te veličina, oblik i raspored perja na vratu jedinke (ANONYMOUS, 2018.). Tijekom spajanja oba spola, potrebno je obavezno imati zasebni hranidbeni sustav te pratiti hranidbeno ponašanje svakodnevno i na tjednoj bazi. Navedena faza suživota oba spola traje do dobi 210. dana.

Treća faza proizvodnje, pod nazivom "vrijeme nesivosti" započinje maksimalno 2 tjedna nakon uvođenja fotostimulacije. Bitne stavke u početku ove faze su da je voda ponuđena *ad libitum*, uvođenje vremena hranidbe nakon 30 minuta ili 6 sati nakon paljenja svjetla, mjerenje zdjelice i potkožja radi određivanja spolne zrelosti, pripreme gnijezda kokošima uz mogućnost postavljanja umjetnih jaja kako bi se potaknuo nagon za nesenjem. Vrh nesivosti se optimalno očekuje u periodu oko 217. dana starosti. Parametri poput proizvodnje jaja, mase jaja, tjelesne mase nesilica i temperature prostora moraju se prosuđivati i mjeriti na dnevnoj i/ili tjednoj bazi. U periodu 224. - 231. dana starosti nesilice proizvode jaja najveće mase. Tijekom perioda deplecije proizvodnje, preporučeno je reducirati unos hrane 5-6 tjedana nakon vrhunca proizvodnje (ANONYMOUS, 2018.).

## 2.2. STRES – HORMONALNA I STANIČNA OSNOVA

Svaki organizam putem prilagodbenih mehanizama, odgovara na nepovoljne utjecaje stresnih situacija. Fiziološki stres je reakcija organizma na djelovanje raznih čimbenika, tj.

stresora, tijekom koje dolazi do povišenja metaboličke i neurohormonalne aktivnosti čija je svrha održavanje homeostaze organizma (MIKEC i sur., 1996.). U suvremenoj proizvodnji perad je izložena različitim oblicima stresora od trenutka kad se izlegne do završetka proizvodnog ciklusa. Najčešći oblici stresora su mikroklimatski (temperatura, vlaga te povećane koncentracije štetnih plinova) i socijalni stresori poput (velika gustoća naseljenosti, transport, manipulacija sa životinjama) te pomanjkanje pojidbenog i hranidbenog prostora. Životinja može na stresor reagirati nespecifično i specifično, što može dovesti do energetske neravnoteže. Permanentni stres može dovesti do pojave imunosupresije i/ili smrti te se smatra glavnim uzrokom gospodarske štete u peradarskoj proizvodnji. Značajne koristi u intenzivnoj proizvodnji imaju metode prepoznavanja i predviđanja stresa kod životinja koje nam omogućuju ublažavanje njegova štetnog djelovanja tijekom cijelog proizvodnog ciklusa u peradarstvu (MIKEC i sur., 1996.).

Nakon utjecaja stresora, mehanizam odgovora organizma odvija se putem simpatičkog živčanog sustava te hipotalamično-hipofizno-nadbubrežne osnove. Početak sinteze hormona, u hipotalamično-hipofiznoj osnovi započinje lučenjem tropnih neurohormona iz hipotalamusa koji putem hipotalamično-hipofiznog portalnog sustava dolaze do stanica hipofize, potiču proizvodnju i lučenje hipofiznih hormona (SJAASTAD i sur., 2016.). U hipotalamusu se luče hormoni koji oslobađaju tireotropin, prolaktin (TRH), gonadotropin (GnRH), kortikotropin (CRH), hormon rasta (GHRH) te hormoni koji inhibiraju hormon rasta (somatostatin) i prolaktin (dopamin). Kao odgovor na neurohormone hipotalamusa, prednji režanj hipofize, adenohipofiza, sintetizirat će i osloboditi hormon koji potiče štitnu žlijezdu (TSH) na lučenje hormona trijodtironina i tiroksina (T3 i T4) te prolaktin koji utječe na mliječnu žlijezdu, jajnike i mozak. Adenohipofiza će na poticaj hipotalamusa stvarati i lučiti folikulostimulacijski hormon (FSH) i luteinizacijski hormon (LH) koje će djelovati na razvoj i funkciju reproduktivnih organa. Nadalje će adenohipofiza sintetizirati i lučiti adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji će u kori nadbubrežne žlijezde dovesti do stvaranja kortizola i kortikosterona. Adenohipofiza će oslobađati hormon rasta čije su primarno ciljno tkivo jetra, kosti i mišići. Neurohipofiza, odnosno stražnji režanj hipofize, pod utjecajem hipotalamusa skladištiti će antidiuretski hormon (ADH) i oksitocin (SJAASTAD i sur., 2016.). Tijekom utjecaja stresora na kokoši, dolazi do povećanja koncentracije kortikosterona čiji nastanak u kori nadbubrežne žlijezde potiče hipofizni hormon ACTH. Još jedan sustav koji se aktivira kao odgovor na stresna stanja je i simpatički živčani sustav, koji također utječe na tkivo nadbubrežne žlijezde te potiče sintezu i stvaranje katekolamina. Sinteza i izlučivanje katekolamina i kortikosterona u krv smatra se primarnim odgovorom organizma na stres, nakon

čega slijedi dalje sekundarni odgovor na stresore, koji uključuje regulaciju koncentracije glukoze u krvi te srčanu frekvenciju. Nakon sekundarnog odgovora dolazi tercijarni odgovor na stres, koji se smatra kao pojava poboljšanja imuniteta, reprodukcije i rasta (SIEGEL, 1987.).

Kapacitet hipofize kokoši za sintezu adrenokortikotropnog hormona, tj. ACTH iznosi oko 1600 ng, dok je aktivnost u plazmi u rasponu vrijednosti od 20 do 150 pg/mL, ovisno o vrsti peradi. Vrhunac aktivnosti ACTH u krvi je nakon 5-10 min nakon utjecaja stresora (COLIN, 2000.). Fiziološki, par nadbubrežnih žlijezda smješten je medijalno i anteriorno u odnosu na bubrege. Nadbubrežne žlijezde imaju glatku površinu, sještene su neposredno u blizini jednoj drugoj, dok su kod nekih vrsta peradi spojene u jednu žlijezdu. Arterijsku krv nadbubrežnoj žlijezdi dovodi kranijalna bubrežna arterija, dok vensku krv odvodi bubrežna vena koja se ulijeva u kaudalnu šuplju venu. Parenhim nadbubrežnih žlijezda sastoji se od 2 tipa tkiva, adrenokortikalno i kromofinsko. Kromofinsko tkivo sastoji se od 2 tipa stanica, epinefrinske stanice koje čine oko 70% i norepinefrinske stanice što čine ostatak (CARSIA i HARWEY, 2000.).

Adrenokortikotropne-stanice raspoređene su u obliku niti koje se sastoje od 2 nasuprotna niza stanica čije su jezgre smještne blizu bazalne lamine. Navedeni oblik niti radijacijski se širi od centra sve do kapsule žlijezde. U literaturi se može naći dodatna podjela nadbubrežnih žlijezdi u 2 zone: subkapsularna i unutarnja zona (CARSIA i HARWEY, 2000.). Subkapsularnu zonu čine 40-60 stanica različitih oblika jezgre, glatkog endoplazmatskog retikuluma, a mitohondriji imaju tubularne kriste. Ova zona ima podudarnosti sa zonom granulosom kod sisavaca te čini osnovu za sintezu hormona aldosterona koji je mineralokortikoid.

Aldosteron se manje sintetizira i izlučuje kod odraslih jedinki. Unutarnja zona sastoji se od stanica čije su jezgre okrugle, sadrže glatki endoplazmatski retikulum i mitohondrije s kristama. Navedena zona slična je zoni fascikulati kod sisavaca te je zadužena za sintezu i lučenje glukokortikoidnog hormona, kortikosterona (CARSIA i HARWEY., 2000.). Određeni udio kortikosterona služi za sintezu aldosterona kao prekusorska molekula. Izmjerena vrijednost poluživota ( $T_{1/2}$ ) kortikosterona i aldosterona u organizmu iznosi oko 15 minuta. Stresori koji utječu na povišenje koncentracije mineralokortikoida i glukokortikoida su smanjeni unos bjelančevina hranom te manipulacija kokošima tijekom zdravstvenih ili proizvodnih zahvata (CARSIA i HARWEY, 2000.).

Stres utječe na povećanje koncentracije kortikosterona u krvi, iako povišena vrijednost kortikosterona u krvi nije najpozdaniji pokazatelj stresne reakcije. Dva najznačajnija stresora su biološki u koji spada promjena temperatura od optimalne, gustoća naseljenosti proizvodnog

sustava te transport, amonijak i endotoksin *E. coli*, brojčano povećanje izvora svjetlosti te prehrambeni stresori poput kronično gladovanje, inzulinski inducirana hipoglikemija, nametnuto mitarenje te post (ALADROVIĆ, 2018.). Glukokortikoidi se transportiraju do ciljnih stanica pomoću transportnih proteina u krvi, transkortina i albumina. Oni imaju različite uloge u organizmu, no prvenstveno imaju ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Glavni učinak glukokortikoida na metabolizam ugljikohidrata jest povećanje glukoneogeneze i glikogeneze u jetri te smanjenje potrošnje glukoze u tkivima ovisnim o inzulinu. Glukokortikoidi potiču i mobilizaciju slobodnih masnih kiselina iz adipocita te pretvorbu u triacilglicerole i ketonska tijela u jetri. Glukokortikoidi smanjuju sintezu bjelančevina i dovode do razgradnje mišićnih proteina kako bi se aminokiseline koristile u glukoneogenzi koja se događa u jetri (ALADROVIĆ, 2018.).

Aktivnost glukokortikoida u krvi u korelaciji je s heterofilno-limfocitnim omjerom (H/L). Povećanjem aktivnosti kortikosterona dolazi do smanjenja broja limfocita i povišenja broja heterofila, što dovodi do povećanja H/L omjera. Navodi se da je H/L omjer pouzdaniji pokazatelj stresa prilikom socijalnih i prehrambenih stresora na jedinku u odnosu na koncentracije kortikosterona u krvi te je manje varijabilan od ukupnog broja heterofila i leukocita u krvi. U usporedbi sa sisavcima, eritrociti i trombociti ptica sadrže jezgru te su trombociti veličinom slični veličini ostalih leukocita. Leukociti koje nalazimo u krvi peradi su bazofili, heterofili, eozonofili, monociti i limfociti (GROSS i SEIEGEL, 1983.). Eozinofili, bazofili, limfociti i monociti oblikom i izgledom odgovaraju istovrsnim stanicama u sisavaca. Heterofili su okrugle stanice sa segmentiranom jezgrom koje u citoplazmi imaju guste, eozinofilne štapiće. Heterofili su u peradi stanice analogne neutrofilima u sisavaca. Heterofili su krvne stanice koje imaju ulogu uklanjanja stranih tvari pomoću fagocitoze. Fagocitoza, jedan od mehanizama nespecifične ili prirodene imunosti, sposobnost je pojedinih tjelesnih stanica da mikroorganizme ili neku drugu stranu tvar unesu u svoju citoplazmu i razgrade enzimima. Sposobnost fagocitoze imaju i neutrofilni granulociti, prirodne ubilačke (eng. *natural killer*, NK) stanice (KAISER, 2010.), stanice monuklearnog fagocitnog sustava u koje spadaju tkivni i pokretni makrofagi (QURESHI i sur., 2000.). Osim spomenute razlike pojavnosti jezgre u nekim krvnim stanicama u odnosu na sisavce, u ptica nalazimo nižu koncentraciju bjelančevina plazme kao i dvostruko višu koncentraciju glukoze u krvi (GROSS i SEIEGEL, 1983). Prema MINIASU (2018.), oko 95% bijele krvne slike kod peradi čine limfociti i heterofili. Limfociti imaju glavnu zadaću u staničnoj i humoralnoj imunosti. T-limfociti čine osnovicu stanične imunosti, dok B-limfociti stvaraju 5 primarnih skupina imunoglobulina (IgA, IgM, IgY (IgG), IgD, IgE). Stresori koji imaju utjecaj na H/L omjer

povisuju aktivnost glukokortikosteroida u krvi. Neki od njih su: infekcije sojevima bakterije *Salmonella Typhimurium* i *Enteritidis* te endotoksikoza uzrokovana bakterijom *Escherichia coli*, temperaturni stres, hranidbena restrikcija, socijalni stresori i transport. U takvim slučajevima veća je vjerojatnost za pojavom ozljede, budući da H/L omjer odražava sposobnost organizma za borbu protiv infekcija nastale povredom, nego kod općih infekcija.

### 2.3. ULOGA I HORMONSKA REGULACIJA VITAMINA D

Vitamin D u prirodi predstavlja kompleksni spoj koji je steroidno-liposolubilni hormon. Veću značajnost ima njegovog aktivni metabolit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , kalcitriol, koji je u organizmu sisavaca i ptica zaslužen za pravilni razvoj tkiva, ponajviše koštanog i mišićnog sustava te homeostazu kalcija i fosfora (WARREN i sur., 2020.). Uz navedene organske sustave, ima bitnu ulogu i u imunološkom odgovoru. Posjeduje funkciju imunomodulatora u kojoj dolazi do porasta broja T–limfocita kod nesilica (GENG i sur., 2018.) te IL-10 u crijevnoj sluznici brojlera (NUNES i sur., 2020.). U istraživanjima je utvrđen imunomodulatorni, antioksidativni, antibakterijski, antivirusni, antialergijski te protuupalni učinak D vitamina te je dokazano sudjelovanje u prevenciji stvaranja tumora (KRISHMAN i FELDMAN, 2021.). Aktivni metabolit vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ima mnoge važne uloge u organizmu ptica i sisavaca. Ovaj spoj u organizmu ptica nastaje iz vitamina  $\text{D}_3$ , kolekaciferola, koji pod utjecajem sunčevog zračenje nastaje u koži promjenom spoja 7-dehidrokolesterola (STAASTAD i sur., 2010.) ili vitamina  $\text{D}_2$ , ergokalciferola, koji je biljnog podrijetla. Premda vitamini  $\text{D}_2$  i  $\text{D}_3$  imaju sličnu biološku aktivnost, protein koji veže vitamin D u plazmi ima vrlo nizak afinitet prema vitaminu  $\text{D}_2$  te se on brže razgrađuje kod ptica (DACKE i sur., 2015.). Pretvorba vitamina  $\text{D}_3$  zbiva se u jetri te bubrezima reakcijama hidroksilacije uz pomoć enzima 25-hidroksilaza te 1-alfa-hidroksilaza pa koncentracija  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ovisi o unosu i sintezi u organizmu, zdravlju jetre i bubrega te paratireoidnom hormonu, estrogenima i prostoglandinima koji utječu na hidroksilaciju (ZHANG i sur., 2010.).

U literaturi autora DACKE, C.G. (2000.) naznačuje se da albumini imaju jedno vezno mjesto za sve metabolite vitamina D, no s različitim rasponom afiniteta za vezanje. Imaju slični afinitet za metabolite  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dok je afinitet manji za  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Nesilice imaju dvostruko veću koncentraciju albumina, nego muške jedinke i jedinke koje nisu spolno zrele. Kolekaciferol povezan s albuminom putuje u jetru, u njoj se događa proces hidroksilacije s enzima 25-hidroksilaza te nastaje metabolit  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Opisani spoj se u



suvišku može akumulirati u masnom tkivu i kasnije otpuštati ako dođe do faze manjka vitamina D. Metabolit vitamina D,  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dalje putuje krvotokom do proksimalnih bubrežnih tubula gdje vitamin D ima dva metabolička puta. U prvom putu dolazi do ponovne reakcije hidroksilacije te nastaje najaktivniji metabolit vitamina D pod nazivom kalcitriol ili  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , no može nastati i neaktivni oblik vitamina D,  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , koji se samo izlučuje iz organizma. Kalcitriol se veže na unutarstanične receptore koji dovode do povećanja broja prijenosnih bjelančevina u stanicama crijeva, bubrega, ljuskovne žlijezde te imunološkog sustava. Kalcitriol utječe na koncentraciju kalcija i fosfora u serumu, potičući crijevnu resorpciju kalcija i fosfora te potičući djelovanje PTH-a na kosti i bubrege. Sintezu kalcitriola regulira paratireoidni hormon (PTH), estrogen i sam kalcitriol. Zbog pada koncentracije kalcija u krvi dolazi do povećanog lučenja PTH što dovodi do povećanja sinteze i lučenja kalcitriola. Hipofosfatemija također utječe na povećanje sinteze kalcitriola (DACKE, C.G., 2000.).

U intenzivnoj proizvodnji kokoši nesilica, kalcitriol se daje u obliku dodataka hrani. U slučaju povećanog unosa kalcitriola može doći do hiperkalcemije te akumuliranja kalcijevih i fosfornih soli u mekim tkivima. Kalcitriol se može umjetno sintetizirati ili se u organizam unosi putem biljke *Solanum glaucophyllum* (SG). Sintetski kalcitriol karakteriziraju brza resorpcija i eliminacija kao i visoka potencija. Stoga je bolji izbor aktivni metabolit iz biljke *Solanum glaucophyllum* (BACHANN i sur., 2012.). Ova biljka potječe s prostora Južne Amerike, bogata je glikoniziranim aktivnim metabolitom D vitamina. Sastav *Solanum glaucophyllum* (SG) čine ugljikohidrati 54.3 %, bjelančevine 24.9 %, minerali 17.1.% i voda 4.1%. Uz navedene spojeve nađeni su i bitni flavonoidi: quercetin (1.11 mg/g ekstrakta biljke), rutin, apinosylorutin te isoquercetin. Znanstvenici su kod određenog broja miševa uspoređivali vrijednosti  $T_{\max}$  i  $T_{1/2}$  nakon aplikacije između sintetskog kalcitriola te kalcitriola iz ekstrakta *Solanum glaucopylium*. Nađene su znatne razlike između navedenih vrijednosti. Nakon aplikacije sintetskog kalcitriola vrijednost  $T_{\max}$ -a bile su nakon 1 sata, a vrijednost  $T_{1/2}$  nakon 23 sata nakon aplikacije. Kod kalcitriola iz SG obadvije vrijednosti su bile više. Vrijednost  $T_{\max}$  je iznosila od 6-12 sati, dok je  $T_{1/2}$  iznosila 30 sati (BACHANN i sur., 2012.).

#### 2.4. METABOLIZAM KALCIJA, FOSFORA I MAGNEZIJA

Homeostaza kalcija, fosfata i magnezija u serumu kokoši regulirana je hormonski vitaminom D, paratireoidnim hormonom i kalcitoninom. Glavni organski sustavi putem kojih se regulira koncentracija navedenih minerala su probavni, bubrežni te koštani. Fiziološka koncentracija kalcija u ptica je iznimno važna i zbog povećane potrebe tijekom stvaranja ljuske

jaja. Hormoni koji održavaju homeostazu Ca u serumu su kalcitriol, paratireoidni hormon, paratireoidnom hormonu slični peptid (PTHrP), prostagladnini te kalcitoninu slični peptid. Kalcitonin nema ulogu u kontroli koncentracije kalcijevih iona u serumu ptica (DACKE, 2000.).

Također, DACKE (2000.) u literaturi iznosi da paratireoidni hormon (PTH) je bjelančevinski hormon koji se sastoji od 88 aminokiselina te je sintetiziran u paratireoidnim žlijezdama. Navedene žlijezde smještene su kaudalnije nego štitnjača te se embrionalno razvijaju iz 3. i 4. branhijske vrećice koje se povezuju s razvojem timusa. Parenhim žlijezda se sastoji od glavnih stanica, dok oksifilne stanice koje su prisutne kod sisavaca, nisu nazočne kod ptica. Još jedna bitna razlika između ptica i sisavaca je u građi glavnih stanica, gdje kod ptica navedene stanice imaju manju koncentraciju citoplazmatskih granula. Koncentracija PTH ciklički se mijenja u serumu nesilica. Visoku aktivnost u serumu ima kod kalcifikacije ljuske jajeta pa dolazi do blagog pada te se ponovno povećava aktivnost hormona 24 sata nakon ovulacije jajne stanice. Na sekreciju paratireoidnog hormona najviše djeluje hipokalcemija u krvi uz koncentracije Mg iona. Ptice su izrazito osjetljive na paratireoidni hormon, aplikacijom kod nesilica postiže se učinak već nakon 8 minuta nakon aplikacije (DACKE, 2000.).

Paratireoidni hormon veže se s tipom 1 PTH receptora u membrani ciljnih stanica ponajviše stanicama koštanog sustava i bubrega. Navedeni hormon posjeduje anabolički i katabolički efekt na koštano tkivo. Vežanjem PTH za receptor pokreću se enzimi fosfolipaza C i adenilat ciklaza te posljedično dolazi do procesa desforilacije proteina, sinteze i lučenja enzima. Povećanje razine cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) dovodi do lučenja kiselina iz osteoklasta. Ovaj proces potiče resorpciju kostiju uz stvaranje kalcitriola u bubrezima te se može inhibirati uz aplikaciju estradiola. PTH povećava resorpciju kalcijevih i fosfornih iona iz kostiju putem dva učinka (GUYTON i HALL, 2012.). Prvi učinak započinje nakon nekoliko minuta te aktivacijom već postojećih koštanih stanica, većinom osteocita. Drugom učinku potrebno je nekoliko dana do nekoliko tjedana da se potpuno razvije. Dolazi do proliferacije osteoklasta posljedične resorpcije kosti. Paratireoidni hormon i aktivni oblik vitamina D imaju receptore na osteoblastima i potiču ih na sintezu citokina koji stimuliraju sazrijevanje osteoklasta. Događaju se lizosomalna sekrecija enzima hidroksilaza i kolagenaza iz osteoklasta, aktiviraju se kiselinske fosfataze, aktiviraju se crpke za vodikove i kalijeve ione, povećava se sinteza hijaluronata te se oslobađaju kalcij i fosfat iz kostiju. Kod bubrežnog tkiva, paratireoidni hormon potiče povećanje glomerularne filtracije uz povećanje resorpcije kalcijevih i magnezijevih iona te sekrecije fosfornih iona. Uz opisane uloge, PTH ima ulogu povećanja aktivnosti 1- $\alpha$ -hidroksilaze u bubrezima (GUYTON i HALL, 2012.).

Paratireoidnom hormonu sličan peptid (PTHrP) bjelančevinski je hormon koji se sastoji od 139 do 173 aminokiselina. Ovaj peptid luči luskovna žlijezda te ima ulogu u stimulaciji bubrežne tubularne reapsorpcije kalcijevih iona, indirektno inhibira lučenja PTH-a te modulira tenziju vaskularnih glatkih mišića u luskovnoj žlijezdi. Vrhunac koncentracije u serumu je tijekom prolaska jajeta kroz jajovod, tj. tijekom kalcifikacijskog perioda (DACKE, 2000.). Kalcitriol u crijevnoj sluznici nesilica ima ulogu u poboljšanju resorpcije kalcijevih iona u krv i transport do tkiva reproduktivnog sustava te ima ulogu u mineralizaciji koštanog tkiva u fazi kalcifikacije ljuske jajeta. Oko 60 % kalcija za sintetiziranje ljuske jajeta proizlazi iz plazme, dok ostalih 40 % potječe iz matriksa medule kosti (KONIG i sur., 2016.). Matriks medule kostiju čini oko 65 % cjelokupne težine kostiju te je sastavljen prvenstveno od kalcijevih i fosfornih soli (VIETES i sur., 2018.). Također, u istraživanju KONINGA i sur. (2016.) opisana je važna uloga luskovne žlijezde koju ima u stvaranju ljuske jajeta te je opisan metabolizam Ca. Smatra se da je koncentracija Ca u jajetu jednaka 10 % cjelokupnoj rezervi kalcija u kostima, a vrijednost od 2-2,5 g kalcija. Tijekom kalcifikacije ljuske jajeta, jetra sintetizira i izlučuje bjelančevine u plazmu sa svrhom vezanja kalcijevih iona. Korelacijski dolazi do povećanja koncentracije ukupnog Ca vezanog za bjelančevine. Transport kalcija u prvih 15 sati tijekom kalcifikacije iz epitalne stanice do lumena jajovoda. U uterusu dolazi do sinteze kristala karbonatne kiseline koji izgrađuju ljusku jajeta (KONING i sur., 2016.).

U literaturi autora GUYTONA i HALLA (2012.), navodi se značaj hormona pod nazivom kalcitonu sličan peptid koji se sastoji od 37 aminokiselina. Sinteza i izlučivanje navedenog peptida događa se unutar središnjeg i perifernog živčanog sustava ptica. Ponajviše je istraživan u retini, leđnoj moždini i živcima koji inerviraju kosti. Navodi se parakrina funkcija u koštanom tkivu u kojem inhibira resorpciju kostiju te je važan vazodilatator. Prostaglandini (PGs) koji su derivati masnih kiselina, imaju sličnu funkciju kao i PTH. Stimuliraju osteoklaste tako da potiču sintezu cAMP i sekreciju lizosomalnog sadržaja te inhibiciju sinteze kolagena te drugi hormoni poput estrogena, glukokortikoida te hormona rasta utječu na homeostazu kalcija.

Magnezij je drugi po zastupljenosti unutarstanični ion koji ima uloge u reguliranju sinteze bjelančevina, aktiviranju enzima, inhibiranju oslobađenja kalcija iz sarkoplazmatske mrežice te je sastavni dio kosti i zubiju (GUYTON i HALL, 2012.). U koštanom sustavu nalazi se oko 54 % magnezija, u mekim tkivima oko 45 % te 1 % u izvanstaničnoj tekućini. Također, ima bitnu ulogu u sekreciji paratireoidnog hormona. Transport magnezija u krv oko 55% odvija se slobodno, dok je ostatak magnezij vezan za serumske bjelančevine, bikabornat, citrat, fosfat. PTH olakšava reapsorpciju magnezija iz debelog kraka Henleove petlje.

U stanici, fosfat je u obliku anorganskih spojeva  $\text{H}_2\text{P}_0_4^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  te u organskom obliku unutar molekula ATP-a, fosfolipida te nukleinskih kiselina. Uz kalcij, fosfat je glavna komponenta za izgradnju kostiju. Oko 86 % fosfata nalazimo u kostima, oko 14 % u unutarstaničnoj tekućini i mekim tkivima, dok je 0,03 % u izvanstaničnoj tekućini. Hormoni koji imaju ulogu u homeostazi fosfata su kalcitriol, PTH i inzulin (GUYTON i HALL, 2012.). PTH i kalcitriol imaju ulogu u imobiliziranju iona fosfata iz stanica te inhibiranju reapsorpcije u distalnim kanalčićima bubrega, dok inzulin služi za mobilizaciju fosfata unutar stanica te potiče reapsorpciju u distalnom kanalčiću. Omjer anorganskog fosfata i kalcija u organizmu je obrnuto proporcionalan. Kada se vrijednost kalcija smanji, vrijednost fosfata poraste te obrnuto. Homeostaza ovih dvaju minerala odvija se povezanim kataboličkim i anaboličkim učinku nad kostima, povećanjem resorpcije iz tankog crijeva i rasponu reapsorpcije u bubrezima (GUYTON i HALL, 2012.).

### 3. MATERIJAL I METODE

Nesilice teške linije Ross 308 u dobi 55.-61. tjedna života bile su glavni subjekt istraživanja. Istraživanje je provedeno na sveukupno 10 000 jedinki koje su, na farmi tvrtke Galivet u Prelogu, bile raspoređene u 2 odvojena objekata po 5 000 životinja. Pokusnoj skupini nesilica u hranu je umiješan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid biljnog podrijetla (Panbonis®, Herbonis, Švicarska). Doza je bila 100g/t što osigurava 1 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg hrane uz 3200 IJ/kg hrane kalciferola. Kontrolna skupina je konzumirala komercijalno dostupnu hranu (potpuna krmna smjesa za teške pasmine) uz suplementaciju 3200 IJ vitamina D<sub>3</sub> po kilogramu hrane. Posebnost hranidbenog režima obje skupine bila je koncentracija fosfora koja je iznosila 0,32 % te 3,4 % kalcija, dok su ostali sastojci bili identični i u skladu s pasminom te dobi nesilica u istraživanju.

#### 3.1. UZORCI

Za svrhu istraživanja, uzeti su uzorci venske krvi punkcijom krilne vene (*v. ulnaris*). Korištene su epruvete s litijevim heparinom kao antikoagulansom (BD Vacutainer™ Li-Heparin 102 IU) i s gelom (BD Vacutainer® SST™ II Advance). Uzrokovanje krvi provedeno je 14., 25., 35. dana nakon početka suplementiranja vitamina D u hranu nesilica.

#### 3.2. ANALIZE

Iz uzoraka krvi određen je ukupan broj leukocita direktnom metodom po Nattu i Herricku brojanjem u Neubauerovom hemocitometru (NATT i HERRICK, 1952.). Krvni razmaz je napravljen neposredno nakon vađenja krvi bez dodavanja antikoagulansa. Morfološki oblici leukocita su diferencirani brojenjem 100 stanica nakon bojenja s May-Grünwald i Giemsa bojama. Izračunat je apsolutni broj pojedinih morfoloških oblika leukocita te omjer heterofila i limfocita. U uzorcima seruma određene su koncentracije kalcija, fosfora i magnezija na biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott, Illinois, USA) s Abbottovim reagensima.

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Vrijednost normalnosti distribucije podataka izmjerena je pomoću Shapiro-Wilk's W testa. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Usporedbe između uzorkovanja su načinjene analizom varijance, a zatim Fisherovim LSD testom u slučaju normalne razdiobe i Kruskal-Wallis ANOVA testom i Dunn testom za sve skupine kada je nulta hipoteza odbačena. Razina  $p \leq 0,05$  smatrana je statistički značajnom

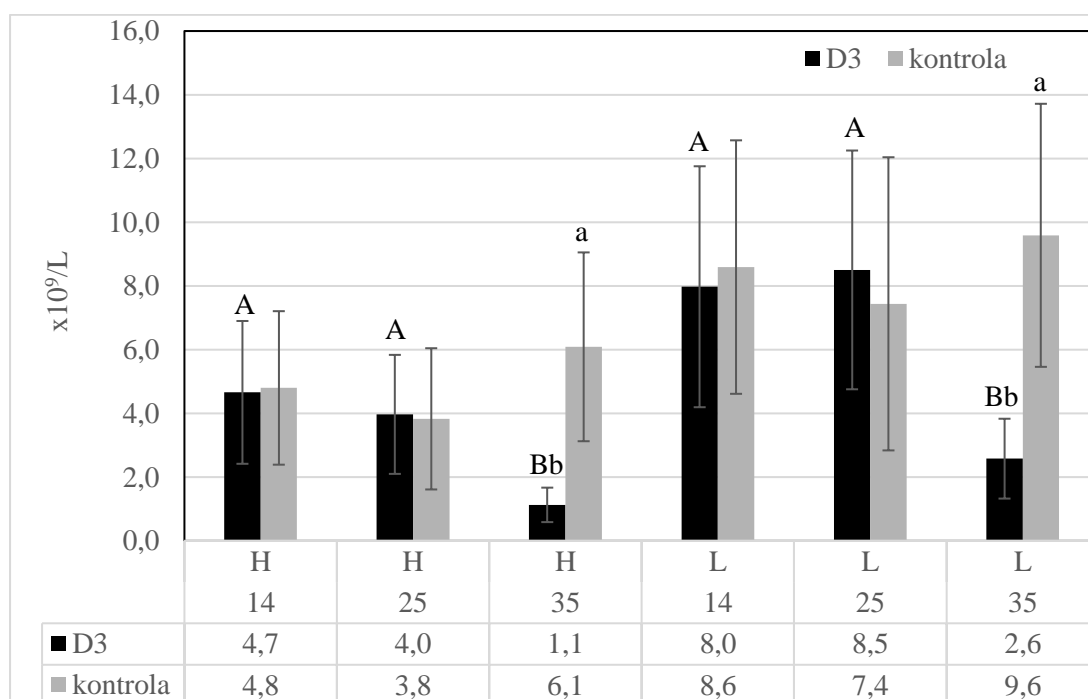
#### 4. REZULTATI

U tablici 1. naveden je udio leukocita (%) u krvi u pokusnoj i kontrolnoj skupini nesilica 14., 25., 35. dan od početka suplementiranja vitaminom D<sub>3</sub>. Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida u hranu pokusne skupine nesilica dovelo je do promjene u udjelu limfocita, heterofila i eozinofila u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida pokusnim nesilicama uzrokovalo je povećanje postotka limfocita, dok je broj eozinofila značajno manji 25. i 35. dana od početka suplementacije u odnosu na kontrolnu skupinu (p<0,05) (tablica 1). U skupini kojoj se dodavao 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid utvrđen je značajno manji postotak heterofila, kao i značajno veći postotak limfocita 25. dana od početka suplemetacije u odnosu na uzorkovanje 14. dana nakon suplementacije (p<0,05). Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> -glikozida pokusnim nesilicama nije dovelo do značajnih promjena u udjelu bazofila i monocita u usporedbi s kontrolnom skupinom (p>0,05).

Tablica 1. Udio leukocita u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni suplement 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja (%). Statističke značajne razlike unutar skupine među danima označene su različitim velikim slovima abecede (**A**, **B**), dok su značajne razlike između skupina na pojedine dane označene različitim malim slovima abecede (**a**, **b**).

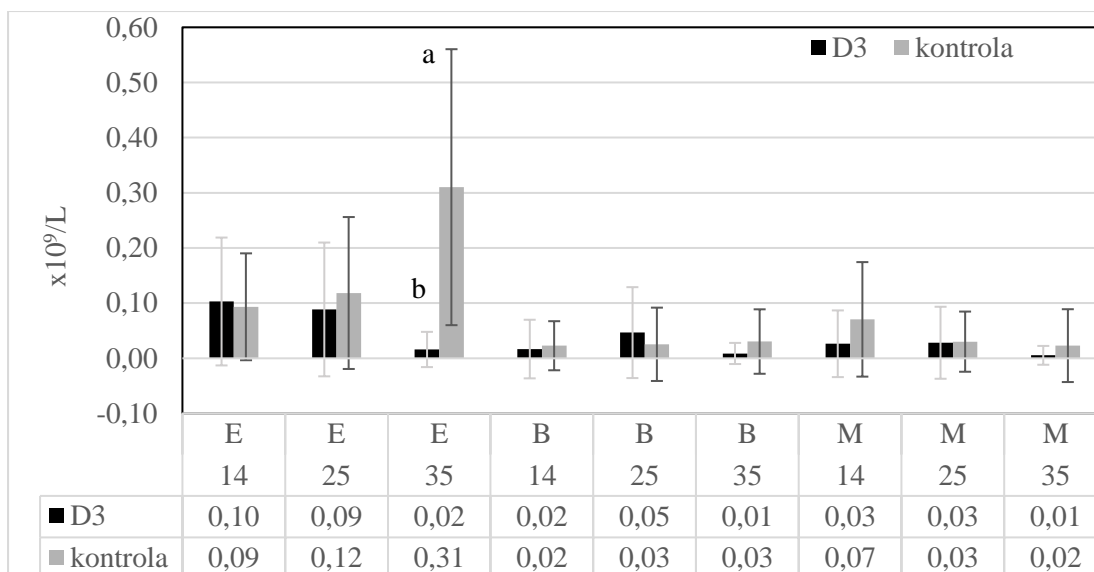
	Dani dodavanja 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -glikozida u hranu					
	14. dan		25. dan		35. dan	
	D <sub>3</sub>	C	D <sub>3</sub>	C	D <sub>3</sub>	C
Heterofili	37,1±7,7 <b>A</b>	36,9±10,5	30,6±5,8 <b>B</b>	35,7±7,7	34,3±9,7 <b>AB</b>	36,5±9,4
Limfociti	61,4±8 <b>B</b>	61,7±10,7	69,2±6,5 <b>Aa</b>	62,1±8,7 <b>b</b>	64,7±10,2 <b>AB</b>	61,5±9,6
Eozinofili	0,8±0,9	0,8±0,9	0,5±0,9 <b>a</b>	1,6±1,5 <b>b</b>	0,7±1 <b>b</b>	1,7±1,2 <b>a</b>
Bazofili	0,1±0,4	0,2±0,4	0,2±0,4	0,3±0,6	0,2±0,4	0,1±0,4
Monociti	0,2±0,4	0,3±0,6	0,2±0,4	0,2±0,4	0,1±0,3	0,1±0,4

Slika 1. prikazuje promjene ukupnog broja heterofila i limfocita u krvi pokusne skupine nesilica nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida u hranu nesilica dovelo je do značajno manjeg ukupnog broja heterofila i limfocita 35 dana od početka suplementacije u usporedbi s kontrolnom skupinom (p<0,05). Značajno manji broj heterofila utvrđen je 25. i 35. dana od početka suplementacije u usporedbi s vrijednostima 14. dana (p<0,05), dok je u broju limfocita ovaj učinak prisutan samo 35. dana uzorkovanja (p<0,05) (slika 1.)



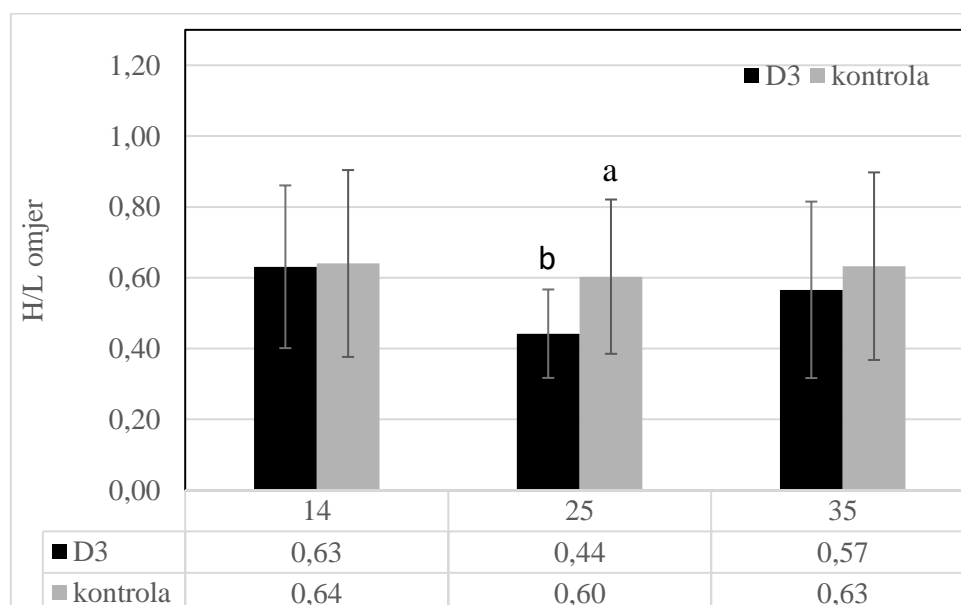
Slika 1. Broj heterofila (H) i limfocita (L) u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja (srednja vrijednost ± SD x10<sup>9</sup>/L). Statistički značajne razlike unutar skupine među danima označene su različitim velikim slovima abecede (A, B), dok su značajne razlike između skupina na pojedine dane označene različitim malim slovima abecede (a,b)





Slika 2. Broj eozinofila (E), bazofila (B) i monocita (M) u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja (srednja vrijednost ± SD x10<sup>9</sup>/L). Statistički značajne razlike između skupina na pojedine dane označene su različitim malim slovima abecede (a, b).

Slika 2. prikazuje promjene ukupnog broja eozinofila, bazofila i monocita u krvi pokusne skupine nesilica nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida u hranu nesilica dovelo je do značajno manjeg ukupnog broja eozinofila 35 dana od početka suplementacije u usporedbi s kontrolnom skupinom (p<0,05). Nisu utvrđene značajne razlike ukupnih brojeva bazofila niti monocita (p>0,05).



Slika 3. Omjer heterofila i limfocita u krvi kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14., 25. i 35. dana od početka dodavanja. Statistički značajne razlike između skupina na pojedine dane označene su različitim malim slovima abecede (a, b).

Značajno manji omjer heterofila i limfocita utvrđen je 25. dana od početka suplementacije u skupini kokoši kojoj je u hranu dodavan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  -glikozid u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p < 0,05$ ) (slika 3.).

Tablica 2. Koncentracija kalcija, fosfora i magnezija (srednja vrijednost  $\pm$  SD; mmol/L) u serumu kokoši nesilica teške linije kojima je u hrani dodan prirodni  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid i kokoši kontrolne skupine 14. i 35. dana od početka dodavanja suplementa. Statistički značajne razlike unutar skupine među danima označene su različitim velikim slovima abecede (**A**, **B**), dok su značajne razlike između skupina na pojedine dane označene različitim malim slovima abecede (**a**, **b**).

Dani dodavanja $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozida u hranu				
	14. dan		35. dan	
	D <sub>3</sub>	C	D <sub>3</sub>	C
Kalcij	5,30 $\pm$ 1,17	5,15 $\pm$ 0,78	5,33 $\pm$ 1,20 <b>a</b>	4,45 $\pm$ 0,78 <b>b</b>
Fosfor	3,54 $\pm$ 0,55 <b>A</b>	3,57 $\pm$ 0,53	2,33 $\pm$ 0,6 <b>B</b>	2,17 $\pm$ 0,35
Magnezij	1,27 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,17	1,26 $\pm$ 0,18 <b>a</b>	1,1 $\pm$ 0,11 <b>b</b>

Koncentracija kalcija i magnezija u skupini koja je primila  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozid u hrani bila je 35. dan od početka suplementacije značajno viša nego u kontrolnoj skupini ( $p < 0,05$ ). Također, koncentracija kalcija je u pokusnoj skupini  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  do 35. dana dodatno blago porasla, dok se u kontrolnoj skupini smanjila. U pokusnoj skupini dodavanje aktivnog metabolita D vitamina dovelo je do značajnog smanjenja koncentracije fosfora u odnosu na uzorkovanje 14. dana od početka suplementacije ( $p < 0,05$ ). Koncentracija magnezija je u pokusnoj skupini ostala gotovo nepromijenjena, dok se u kontrolnoj skupini značajno smanjila do 35. dana pokusa ( $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju dodavanje aktivnog oblika D vitamina biljnog podrijetla u hranidbu nesilica teške linije Ross 308 uzrokovalo je pad ukupnog broja heterofila, limfocita i eozinofila, uključujući povećanje postotka limfocita i koncentracije kalcija te održavanje homeostaze magnezija u krvi.

Vitamin D se u hranu životinja može dodavati u obliku vitamina D<sub>3</sub> ili vitamina D<sub>2</sub>, pri čemu se vitamin D<sub>2</sub> brže razgrađuje u ptica (DACKE i sur., 2015.). U istraživanju se koristio 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid kao oblik vitamina D<sub>3</sub> izoliran iz biljke *Solanum glaucophyllum*. Navedeni spoj neposredno nakon resorpcije u probavnom sustavu raspoloživ je u organizmu te se oko 2-3 puta sporije izlučuje nego sintetski 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (BACHMANN i sur., 2012.). ALVES i sur. (2018.) istraživali su utjecaj na prirast, konverziju hrane i kvalitetu kosti brojlera nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> -glikozida u hranu. Dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> -glikozida u hranu istraživali su također i Nunes i sur. (2020.) te utvrdili u brojlera izloženih liposaharidima *Escherichia coli* povoljan utjecaj na održavanje prirasta, bez utjecaja na mineralizaciju kostiju. KRISHMAN i FELDMAN (2011.) navode ulogu kalцитriola u anti-upalnim djelovanjima putem supresije prostaglandina i inhibicije signalizacije stres kinaze te posljedično stvaranje pro-upalnih citokina. Ostali važni učinci uključuju supresiju tumorske angiogeneze, invazije i metastaza.

Limfociti i heterofili su dvije najzastupljenije klase leukocita u ptica, koje su od iznimne važnosti u adaptivnoj i urođenoj imunskoj reakciji organizma. U ovom istraživanju su utvrđene prosječne vrijednosti heterofila od 31% do 37% te limfocita od 61% do 69%. U prva dva uzrokovanja, ukupne vrijednosti broja heterofila kretale su se u rasponu od 4,0 do 4,7 x10<sup>9</sup>/L dok su vrijednosti limfocita bile u rasponu od 8 do 8,5 x10<sup>9</sup>/L. Navedene vrijednosti bile su unutar referentnih intervala (BOUNOUS i STEDMAN, 2000.; WEKENELL, 2010.). U radu je utvrđen omjer heterofila i limfocita (H/L), pri čemu povišeni omjer H/L predstavlja kortikosteronom posredovan odgovor na vanjske stresore i dobar je pokazatelj fiziološkog stresa (GROSS i SIEGEL, 1983.). U ovom istraživanju uočeno je smanjenje omjera H/L nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida u hranu nesilicama te se može pretpostaviti da je dodatak ublažio djelovanje stresa. U peradi se hipotalamohipofizno-adrenokortikalna os sastoji od hormona koji oslobađa kortikotropin i argininskog vazotocina koji se oslobađaju iz hipotalamusa; adrenokortikotropnog hormona koji luči prednji režanj hipofize; i glukokortikoidnih hormona, kortikosterona, kojeg sintetiziraju stanice nadbubrežne žlijezde. Poznato je kako mnogi stresori kod peradi povećavaju cirkulirajuću koncentraciju

kortikosterona. Budući da glukokortikoidi utječu na omjer H/L, pod djelovanjem stresa dolazi do pomaka H/L (SCANES, 2016.). Istraživanja pokazuju kako se broj heterofila u uzorcima krvi peradi povećava, a broj limfocita smanjuje kao odgovor na stresore i povećanje razine kortikosterona u plazmi (GROSS i SIEGEL, 1983.). U ovom istraživanju značajni pad H/L omjera utvrđen je već nakon 25 dana od početka dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida biljnog podrijetla u hranu nesilica te bi mogao biti pokazatelj ublažavanja djelovanja stresa na jedinke.

Uz smanjenje omjera H/L, dodatak 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida ima i povoljni učinak na kvalitetu jaja, tako što čini tvorbu ljuske jajeta održivijom, povećava čvrstoću ljuske jajeta te smanjuje negativni utjecaj dobi na kvalitetu ljuske jajeta (GOTTSTEIN i sur., 2022.). Čimbenici koji su potrebni za kvalitetnu proizvodnju ljuske jajeta su mangan, bakar, cink, vitamini D te vitamin C, koji služe kao aktivatori enzima uključenih u proizvodnju ljuske (JOHNSON, 2015.). Nadalje, važni su i magnezij, fosfor i kalcij koji se odlažu u ljusku u obliku kalcijevog karbonata, magnezijevog karbonata te trikalcijevog fosfata (JOHNSON, 2015.). Vrijednost koncentracije kalcija za perad iznosi 7,1 mmol/L (KANEKO i sur, 2008.). U ovom istraživanju utvrđene su niže vrijednosti koncentracije kalcija u krvi od spomenutih te su bile slične rezultatima KÖLLINGA i sur. (1992.) utvrđenim na nesilicama. Dodavanje aktivnog metabolita D vitamina uzrokovalo je povišenje vrijednosti koncentracija kalcija u krvi kod pokusne skupine nesilica u odnosu na kontrolnu skupinu. Vitamin D<sub>3</sub> povećava resorpciju kalcija u duodenumu putem aktivnog transporta vežući se za receptore u jezgri enterocita te uzrokuje transkripciju i translaciju za barem tri transportne bjelančevine za kalcij (kanali za kalcij, bjelančevina koja veže kalcij, kalcijeva pumpa) (REECE i sur., 2015.).

U ovom istraživanju došlo je do porasta koncentracije magnezija u krvi pokusnih nesilica nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida u hranu. VENGLOVSKA i sur. (2004). navode kako je koncentracija magnezija povezana s većom kvalitetom ljuske jajeta i boljom proizvodnošću jaja. Pozitivan utjecaj magnezija na čvrstoću ljuske jajeta pokazuje i istraživanje KIM i sur. (2013). Autori navode kako se čvrstoća ljuske poboljšala kada se nesilicama davala hrana s većim udjelom magnezija. Fiziološke koncentracije magnezija u plazmi ovisne su gotovo u potpunosti o opskrbi magnezijem iz hrane te o resorpciji u jejunumu (REECE i sur., 2015.). U istraživanju je ustanovljeno da pokusna skupina nesilica nakon dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida posjeduje veće vrijednosti koncentracije magnezija u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Praćenje proizvodnje peradi u intenzivnoj proizvodnji od iznimnog je značenja. Dodaci prehrani s pozitivnim učincima na proizvodnju, dobrobit i držanje životinja mogu se pratiti hematološkim i biokemijskim pokazateljima.
2. Dodatak  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozida u hranu nesilicama nakon 55. tjedna starosti smanjuje omjer H/L što ukazuje na ublažavanje djelovanja stresa i manju osjetljivost na stres.
3. Dodatak  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -glikozida u hranu nesilicama nakon 55. tjedna starosti povećava koncentraciju kalcija i održava koncentraciju magnezija, što pridonosi proizvodnji kvalitetnije ljuske jajeta.

## 7. LITERATURA

1. ANONYMOUS (2018): AVIAGEN ROSS PARENTSTOCK MANAGEMENT HANDBOOK, 7-188.
2. ALADROVIĆ, J. (2018): Odabrana poglavlja endokrinologije domaćih životinja, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
3. ALVES, O. D. S., L. CALIXTO, A. H. B. ARAUJO, K. A. A. TORRES, T. L. REIS, A. A. CALDERANO (2018): Decreased levels of vitamin D<sub>3</sub> and supplementation with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural*. 48, 8.
4. BACHMANN, H., E. OFFORD-CAVIN, P. PHOTHIRANTH, M. N. HORCAJADA, P. ROMEIS, G. A. MATHIS (2012): 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside of herbal origin exhibits delayed release pharmacokinetics when compared to its synthetic counterpart. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 136, 333-336.
5. BOUNOUS, D. I., N. L. STEDMAN (2000): Normal avian hematology: chicken and turkey. In Schalm's *Veterinary Hematology* 5<sup>th</sup> Ed. (B. F. Feldman, J. G. Zinkl, N. C. Jain, Eds.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 1147-1154.
6. COLIN, G. S (2000): Introduction to Endocrinology. In *Sturkie's Avian Physiology* 5<sup>th</sup> Ed. (C. G. Scanes, Ed.), Elsevier Inc, 438-450.
7. CHARZIA, R. V., S. HARWEY (2020): Adrenals. In *Sturkie's Avian Physiology* 5<sup>th</sup> Ed. (C. G. Scanes, Ed.), Elsevier Inc., 489-518
8. CHAMPBEL, T. W. (2010): Hematology of Psittacines. In *Schalm's veterinary hematology* 6<sup>th</sup> Ed. (D. J. Weiss, K. J. Wardrop) Blackwell Publishing Ltd, SAD, 968-976.
9. DACKER, C. G. (2000): The Parathyroid, Calcitonin and vitamin D. In *Sturkie's Avian Physiology* 5<sup>th</sup> Ed. (C. G. Scanes, Ed.), Elsevier Inc., 474-484.
10. DACKER, C. G., T. SUGIYAMA, C. V. GAY (2015): The Role of Hormones in the Regulation of Bone Turnover and Eggshell Calcification. In *Sturkie's Avian Physiology* 6<sup>th</sup> Ed. (C. G. Scanes, Ed.), Elsevier Inc., 549-569.
11. DAVIDSON, T.F., I. H. FLACK (1981): Changes in the peripheral blood leucocyte populations following an injection of corticotrophin in the immature chicken. *Res. Vet. Sci.* 30, 79–82.

12. GENG, Y., Q. MA, Z. WANG, Y. GUO (2018): Dietary vitamin D<sub>3</sub> supplementation protects laying hens against lipopolysaccharide-induced immunological stress. *Nutr. Metab.* 15, 58.
13. GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, D. HORVATEK TOMIĆ, J. MILJKOVIĆ, J. ALADROVIĆ, A. SHEK VUGROVEČKI, D. BEDEKOVIĆ, K. BUHLER (2022): Improvement of egg shell parameters in broiler breeders fed diets supplemented with natural 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *International Poultry Scientific Forum, Atlanta, Georgia, USA*, 108.
14. GROSS, W.B., H. S. SIEGEL (1983): Evaluation of heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27, 972–979.
15. GUYTON, A.C., HALL, J.E. (2012): *Medicinska fiziologija*, 12. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb
16. Hrvatska poljoprivredna agencija (HPA). Odjel za uzgoj, selekciju i razvoj ovčarstva, kozarstva i malih životinja. Uputstvo za uzgoj i držanje kokoši Hrvatica. Zagreb, 2009.
17. JOHNSON, A. L. (2015): Reproduction in the Female. In *Sturkie's Avian Physiology* 6<sup>th</sup> Ed. (C. G. Scanes, Ed.) Elsevier Inc., 635-667.
18. JOŽEF, N., BERIĆ, Ž. (1995.): *Peradarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb
19. KAISER, P. (2010): Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 39, 309–324
20. KANEKO, J. J., J. W. HARVEY, M. BRUSS (2008): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Academic Press, San Diego, California, SAD., 896-897.
21. KIM, C. H., I. K. PAIK, D. Y. KIL (2013): Effect of increasing supplementation of magnesium in diets on productive performance and eggshell quality of aged laying hens. *Biol. Trace Elem. Res.* 151, 38-42.
22. KÖNIG, H. E., I. WALTER, H. BRAGULLA, R. KORBEL (2016): Female genital organs. In *Avian Anatomy, Textbook and Colour Atlas* 2<sup>nd</sup> Ed. (König, H. E., R. Korb, H.-G. Liebich, Eds.), 5m Publishing, Sheffield, UK, 147-157.
23. KÖLLING, K., A. HOFMEIER, M. MERKENSCHLAGER (1992): The ionized calcium in the blood of domestic chickens: dependence on age and sex. *Zentralbl Veterinar. Med. A.* 39, 105-114.
24. KRALIK, G., SCHON HAS, E., KRALIK, D., ŠPERANDA M. (2008.): *Peradarstvo. Biološki i zootehnički principi*. Grafika Osijek, Osijek

25. KRISHNAN, A. V., D. FELDMAN (2011): Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 311-36.
26. LEWIS, P.D., DANISMAN, R., GOUS, R.M. (2010.): Photoperiods for broiler breeder flocks during laying period. *Poult. Sci.* 89, 108.-114.
27. LIPS, P. (2006): Vitamin D physiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92, 4.-8.
28. MATTILA, P., ROKKA, T., KONKO, K., VALAJA, V., ROSSOW, L., RYHANEN, E.L. (2003): Effect of cholecalciferol-enriched hen feed on egg quality. *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 51., 283.-287.
29. MIKEC, M., LUKAČ NOVAK, I. (1996.): Djelovanje stresa na zdravlje i proizvodnost peradi. *Savjetovanje Peradarski dani 1996.*, 76.-81.
30. NATT, M. P., C. A. HERRICK (1952): A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31, 735.–738.
31. NUNES, R. A., M. D. S. DUARTE, P. H. R. F. CAMPOS, L. L. D. OLIVEIRA, F. F. E. SILVA, B. S. KREUZ, C. G. MIRABILE, S. O. BORGES, A. A. CALDERANO (2020): Active vitamin D<sub>3</sub>-glycoside preserves weight gain and modulates the inflammatory response in broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 270,114704.
32. PIOTR MINIAS (2018): Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life-history traits: A comparative analysis across the avian tree of life. *J. Anim. Eco.* 88, 555-563
33. QURESHI, M. A, C. L. HEGGEN, I. HUSSAIN (2000): Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 103–119
34. REECE, W. O., H. H. ERICKSON, J. P. GOFF, E. E. UEMURA (2015): Dukes' *Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Inc. Iowa, SAD, 570.-590.
35. SCANES, C. G. (2016): Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. *Poult. Sci.* 95, 2208–2215
36. SIEGEL, H.S. (1987): Effect of behavioural and physical stressors on immune response. In: Wiebkema, P.R., van Adrichem, P.W.M. (eds.). *Biology of stress in farm animals: an integrative approach*. Martinus Nijhoff, Dordrecht. Pp. 39.-54.
37. SJAASTAD, O. V., O. SAND, K. HOVE (2010): Fiziologija domaćih životinja. Ur. Milinković Tur, S., M. Šimpraga, Naklada Slap, Jastrebarsko, HR, 270.-277.
38. SENČIĆ, Đ. (2011): Tehnologija peradarske proizvodnje, Poljoprivredni fakultet u Osijeku



39. VENGLLOVSKA, K., L. GRESAKOVA, I. PLACHA, M. RYZNER, K. COBANOVA (2014): Effects of feed supplementation with manganese from its different sources on performance and egg parameters of laying hens. *Czech J. Anim. Sci.* 59, 147-155.
40. VIEITES, F.M., BRUSAMERELO, E., VIEIRA, B.S., SOUZA, C.S., CORREA, G.S.S., CARAMORI, J.G., MORES., G.H.K (2018): 1,25-dihydroxycholecalciferol from *Solanum glaucophyllum* supports normal growth and reduces the negative effects of calcium and phosphorus restriction on broilers bone tissue. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 39, no. 5, 2205.-2214.
41. WAKENELL, P. S. (2010): Hematology of Chickens and Turkeys. in Schalm's veterinary hematology 6th Ed. (D. J. Weiss, K. J. Wardrop, Eds), Blackwell Publishing Ltd, SAD, 958-967.
42. WARREN, M. F., T. C. VU, O. T. TOOMER, J. D. FERNANDEZ, K. A. LIVINGSTON (2020): Efficacy of 1-a-hydroxycholecalciferol supplementation in young broiler feed suggests reducing calcium levels at grower phase. *Front. Vet. Sci.* 7, 245.
43. ZHANG, R., D. P. NAUGHTON (2010): Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr. J.* 9, 65.

## 8. SAŽETAK

### **“Diferencijalna krvna slika u kokoši teške pasmine hranjene uz dodatak prirodnog 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida”, autora Ivana Lošića**

Aktivni metabolit vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ima mnoge važne uloge u organizmu ptica i sisavaca. U intenzivnoj proizvodnji je važno pravovremeno praćenje zdravlja peradi, pri čemu hematološke i biokemijske pretrage mogu biti od iznimnog značaja. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodavanja 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida biljnog podrijetla u hranu na ukupan broj i populacije leukocita te koncentracije kalcija, fosfora i magnezija u krvi. Istraživanje je provedeno na 10000 nesilica kokoši teške linije Ross 308. Pokusnoj skupini nesilica u hranu je umiješan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid biljnog podrijetla, dok je kontrolna skupina konzumirala komercijalno dostupnu hranu, sukladno preporukama za genetiku. Uzorci venske krvi uzeti su punkcijom krilne vene u epruvete s litijevim heparinom kao antikoagulansom i u epruvete s gelom. Krv je uzorkovana 14, 25 i 35 dana od početka dodavanja pripravka vitamina D u hranu. U uzorcima krvi određen je ukupan broj leukocita te su iz krvnog razmaza diferencirane morfološki populacije leukocita. Izračunat je apsolutni broj pojedinih morfoloških oblika leukocita te omjer heterofila i limfocita. U uzorcima seruma određene su koncentracije kalcija, fosfora i magnezija. U ovom istraživanju dodavanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozida biljnog podrijetla u hranu nesilica dovelo je do smanjenja ukupnog broja heterofila, limfocita i eozinofila uz povećanje postotka limfocita, te povećanje koncentracije kalcija i magnezija u krvi. Na osnovi rezultata možemo zaključiti kako suplementiranje nesilica 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozidom nakon 55. tjedna starosti smanjuje omjer H/L ukazujući na manju osjetljivost na stres, te povećava koncentraciju kalcija u serumu čime je omogućena proizvodnja kvalitetnije ljuske jaja.

#### **Ključne riječi:**

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> -glikozid, nesilice, limfociti, heterofili, eozinofili, kalcij, fosfor, magnezij

## 9. SUMMARY

### **“Differential blood cell count in broiler breeder hens fed with addition of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycoside”, author Ivan Lošić**

The active metabolite of vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, has many important roles in birds and mammals. In intensive production, timely monitoring of poultry health is important, and hematological and biochemical tests can be extremely important. The aim of this study was to determine the effect of adding 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycosides of plant origin to poultry feed on the total number and population of leukocytes and the concentration of calcium, phosphorus and magnesium in the blood. The study was conducted on 10,000 broiler breeder hens of the Ross 308 line. The experimental group of laying hens was fed with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycoside of plant origin, while the control group consumed commercially available food, according to genetic recommendations. Venous blood samples were taken by wing vein puncture in lithium heparin anticoagulant and in gel tubes. Blood was taken 14, 25 and 35 days after the start of adding vitamin D supplement into feed. The total number of leukocytes in the blood samples was determined together with populations of leukocytes differentiated from the blood smear. The absolute number of individual leukocytes' populations and the ratio of heterophiles to lymphocytes were calculated. Concentrations of calcium, phosphorus and magnesium were determined in serum samples. In this study, the addition of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycosides of plant origin to laying hens led to a decrease in the total number of heterophiles, lymphocytes and eosinophils with an increase in the percentage of lymphocytes and an increase in blood calcium and magnesium levels. Based on the results, we can conclude that supplementation of laying hens with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycoside after 55 weeks of age temporarily reduces the H/L ratio indicating lower sensitivity to stress, and increases serum calcium concentration, which allows the production of better quality egg shells.

#### **Keywords:**

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycoside, laying hens, lymphocytes, heterophiles, eosinophils, calcium, phosphorus, magnesium

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 5.8.1996. godine u Rijeci. Završio sam Osnovnu školu Zvonka Cara u Crikvenici te Pazinski kolegij-klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Pazinu. U lipnju, 2016. godine upisao sam integrirani studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na petoj godini studija, usmjerio sam se specijalni smjer Javnog zdravstva. Tijekom studija završio sam tečajeve pod nazivom "African swine plague in wild boars – basics and preventive measure" te "Exceliranje ili kako izraditi tablice, grafikone i formule". Sudjelovao sam u izradi 2 znanstvena rada. Na četrnaestom znanstveno-stručnom simpoziju "Peradarski dani 2022.", održanom u Poreču, prezentiran je znanstveni rad pod nazivom "Prirodni 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glikozid ublažava posljedice stresa i povećava koncentraciju kalcija i magnezija u serumu kokoši teške pasmine u završnoj fazi proizvodnje" čiji sam suautor. Također, u znanstvenom časopisu "Vaccine, Volume 10, Issue 9", objavljen je članak "Autogenous *E. coli* vaccine application as an innovative antimicrobial therapy in poultry farming – a case report" čiji sam sudionik izrade. Dobitnik sam stipendije tvrtke Agroproteinke d.d od 2021. godine. Od 2022. godine volontiram u molekularnom i mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za bolesti peradi s klinikom na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Uz navedeno volontiranje, 4 mjeseca sam volontirao u Vet Centru Crikvenica.