Utjecaj izvora kalcija u hrani na koncentraciju kalcija u krvi kokoši nesilica

Belezni, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:092827

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Josip Belezni

UTJECAJ IZVORA KALCIJA U HRANI NA KONCENTRACIJU KALCIJA U KRVI KOKOŠI NESILICA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Genetika i oplemenjivanje životinja

Josip Belezni

UTJECAJ IZVORA KALCIJA U HRANI NA KONCENTRACIJU KALCIJA U KRVI KOKOŠI NESILICA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Krešimir Salajpal

Zagreb, 2016

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____ s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Krešimir Salajpal _____

2. Prof.dr.sc. Zlatko Janječić _____

3. Doc. dr. sc. Goran Kiš _____

SAŽETAK

Kalcij je esencijalan mineral koji je neophodan za normalno funkcioniranje životinjskog organizma, te ga je potrebno svakodnevno unositi hranom. Kod kokoši nesilica kalcij ima posebno važnu ulogu, ponajviše zbog njegove ugradnje u ljusku jajeta, te ga je važno dodavati u hrani kako bi se zadovoljile potrebe za kalcijem. Ljuska jajeta zbog velikog udjela kalcija može se upotrebljavati kao izvor kalcija kako kod kokoši nesilica, tako i kod drugih životinjskih vrsta. Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi utjecaj ljuske jajeta kao izvora kalcija u hrani na koncentraciju kalcija u krvi kokoši nesilica. Istraživanje je provedeno na 75 kokoši nesilica ISA Hisex Brown, starosti 22 tjedna. Kokoši su podijeljene u pet grupa s obzirom na omjer ljuske jajeta i vapnenca u krmnoj smjesi: 100% vapnenca, 100% grubo mljevene ljuske jajeta, 100% fino mljevene ljuske jajeta, fino mljevena ljuska jajeta i vapnenac u omjeru 50:50%, grubo mljevena ljuska jajeta i vapnenac u omjeru 50:50%. Uzorci krvi za analizu uzeti su punkcijom krilne vene 15. i 30. dana pokusa, a analizom je određena koncentracija kalcija.

Upotreba ljuske jajeta kao izvora kalcija u hrani kokoši nesilica nije imala značajnog utjecaja na koncentraciju kalcija u krvi. Tretmani koji su uključivali 100% sitnu i 100% krupnu ljusku, samo vapnenac, i smjesu vapnenca i krupno mljevene ljuske jajeta u omjeru 50:50% nisu pokazivali značajne razlike u koncentraciji kalcija u krvi. Značajno niže vrijednosti koncentracije kalcija u krvi zabilježene su kod kokoši nesilica koje su hranjene smjesom vapnenca i sitno mljevene ljuske u omjeru 50:50%. S obzirom da tretman koji sadržava isti omjer vapnenca, ali ima veću veličinu čestica ne pokazuje niže vrijednosti, možemo zaključiti da veličina čestica igra ulogu u iskorištavanju kalcija iz hrane. Stoga se preporučuje da se u hrani kao izvor kalcija upotrebljava ljuska jajeta s većom veličinom čestica, što pridonosi duljem zadržavanju kalcija u želucu i pospješuje njegovu iskoristivost. Ljuska jajeta kao nusproizvod u korištenju jaja može se upotrebljavati kao izvor kalcija u hrani kao zamjena ili dopuna vapnencu, najčešće korištenom izvoru kalcija u hrani kokoši nesilica. Nadalje, navedeno smanjuje i količinu otpada koja zaostaje prilikom korištenja i proizvodnje jaja što predstavlja ekološki vrlo prihvatljiv postupak.

Ključne riječi: ljuska jajeta, izvor kalcija, kokoši nesilice.

ABSTRACT

Calcium is an essential mineral which is necessary for normal functioning of the animal organism, and it should be supplied daily in food. In laying hens calcium plays a particularly important role, mainly because of its incorporation into the eggshell, and it is important that it is supplemented in food in order to fulfil calcium requirements. The eggshell, due to its large proportion of calcium, can be used as a source of calcium both for laying hens and for other animal species. Therefore, the aim of this paper was to determine the influence of the eggshell as a source of calcium in food on the blood calcium concentration of laying hens. The study was conducted on 75 Hisex ISA Brown hens aged 22 weeks. The laying hens were divided into five groups based on the ratio of eggshells to limestone in the compound feed: 100% limestone, 100% coarsely crushed eggshells, 100% finely crushed eggshells, finely crushed eggshells and limestone in the ratio 50:50%, coarsely crushed eggshells and limestone in the ratio 50:50%. Blood samples for analysis were taken by wing vein puncture on the 15th and the 30th day of the experiment; calcium concentration was determined by the analysis.

The use of eggshell as a source of calcium in the food of laying hens had no significant influence on blood calcium concentration. The treatments that involved 100% finely crushed eggshells and 100% coarsely crushed eggshells, 100% limestone, and a mixture of limestone and coarsely crushed eggshells in the ratio 50:50%, did not show significant differences in blood calcium concentration. Significantly lower blood calcium concentration was recorded in laying hens that were fed with a mixture of limestone and finely crushed eggshells in the ratio 50:50%. Since the treatment that contains the same ratio of limestone but has a larger particle size does not show lower values, we can conclude that particle size plays a role in the exploitation of calcium from food. It is therefore recommended that eggshell with a larger particle size is used as a source of calcium in food, which contributes to longer retention of calcium in the gizzard and enhances its usability. The eggshell as a by-product of the use of eggs can be used as a source of calcium in food as a substitute or supplement to limestone, the most frequently used source of calcium in the food of laying hens. Furthermore, this also reduces the amount of waste generated in the use and production of eggs, which is a very environmentally friendly process.

Keywords: eggshell, source of calcium, laying hens.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. KALCIJ (Ca) 2

1.2. METABOLIZAM KALCIJA 3

1.2.1 Prijenos kalcija kroz staničnu membranu 3

1.2.2 Skladištenje 3

1.2.3 Apsorpcija kalcija 4

1.3. FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU 5

1.3.1 Stanična signalizacija 6

1.3.2 Prijenos živčanog podražaja 7

1.3.3 Kontrakcija mišića 8

1.3.4 Zgrušavanje krvi 8

1.4 POREMEMEĆAJI UZROKOVANI MANJKOM ILI VIŠKOM KALCIJA 9

1.5 MINERALNE TVARI KOD PERADI 11

1.5.1 Hranidba kalcijem 11

1.5.2 Ljuska jajeta kao izvor kalcija 13

1.5.3 Kalcij i kvaliteta ljuske jajeta 13

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 17

3. MATERIJALI I METODE 17

4. REZULTATI I RASPRAVA 18

5. ZAKLJUČAK 26

6. LITERATURA 27

1. UVOD

Kalcij ima vrlo važnu ulogu u organizmu životinje, a njegov najveći dio služi za izgradnju kosti i zubi (oko 99%). Iako većina kalcija služi kao strukturni dio kosti, preostali dio kalcija (1-2%) sudjeluje u kontrakciji mišića, regulaciji aktivnosti enzima, međustaničnoj komunikaciji, zgrušavanju krvi, provođenju živčanih impulsa, permeabilnosti membrane, izlučivanju hormona, vazokonstrikciji i vazodilataciji te nizu drugih fizioloških procesa u organizmu.

Najveće potrebe životinje za kalcijem su kod mladih životinja za osifikaciju kostura, a zatim i kod starijih u razdoblju bređosti, laktacije i napose nesivosti. Koncentracija kalcija u organizmu je strogo nadzirana hormonskim putem i kod zdrave životinje uvijek se kreće u granicama referentnih vrijednosti. Disbalans kalcija u organizmu životinje može dovesti do pojavnosti raznih bolesti, te ukoliko se na vrijeme ne započne s liječenjem u konačnici može izazvati i smrt. Stoga je jako bitno znati u kojim stanjima je potreba za kalcijem povećana, te putem hrane istu nadoknaditi kako bi životinja mogla nesmetano davati svoj proizvodni maksimum.

Poznato je da kokoši u tijeku nesivosti imaju povećanu potrebu za kalcijem i posebno su osjetljive na njegov nedostatak. Ukoliko dođe do nedostatka kalcija promjene se očituju u kakvoći ljuske, valivosti, nesivosti, perzistenciji, čvrstoći kostura. Resorpcija kalcija iz hrane odvija se najvećim dijelom u tankom crijevu, a ovisi o prisutnosti vitamina D, te ostalih nutrijenata, kao i o izvoru kalcija iz hrane. Kao najčešći izvor kalcija u hrani kokoši nesilica se koristi vapnenac $CaCO_3$. Ljuska jajeta koja zaostaje kao nusprodukt u industrijskoj preradi jaja zbog sadržaja kalcija također može poslužiti kao izvor kalcija u hrani kokoši nesilica.

Cilj ovog rada je utvrditi koncentraciju kalcija u krvnom serumu kokoši nesilica koje su hranjene različitim izvorom kalcija. Kao izvor kalcija koristit će se mljevenu ljuska jajeta odnosno vapnenac ($CaCO_3$) u različitim omjerima.

1.1. KALCIJ (Ca)

Kemijski element kalcij spada u skupinu zemno-alkalijskih metala. Kemijski simbol u periodnom sustavu elemenata mu je Ca. Dvovalentni je kation čija relativna atomska masa iznosi 40,08, a atomski broj je 20. Kalcij je jedan od najrasprostranjenijih elemenata u prirodi s masenim udjelom od 3,63 % u Zemljinoj kori. Glavni minerali u kojima se nalazi kalcij jesu silikati, karbonati, sulfati, fosfati i fluoridi. Kalcij karbonat ($CaCO_3$) u obliku vapnenca izgrađuje čitave planine, a i danas se stvaraju nove količine kalcijeva karbonata od kostura morskih životinja koje se talože na dnu mora. Sadra ili gips ($CaSO_4 \times 2H_2O$) je također vrlo raširen mineral nastao od vapnenca na koji je djelovala sulfatna kiselina dobivena oksidacijom sulfidnih minerala. Elementarni kalcij je sjajan, mekan, srebrno bijeli metal, koji polako reagira s kisikom, vodenom parom i dušikom iz zraka, a temperature vrelišta iznosi 1484 ºC, a tališta 839 ± 2 ºC. Gorenjem na zraku daje blještavu narančasto-crvenu svjetlost. S čistim kisikom kalcij burno izgara uz stvaranje oksida (CaO), a na zraku se brzo prekrije filmom nitrida. Kalcijeve soli su često dobro topljive u vodi, s iznimkom hidroksida, sulfata, karbonata i fosfata.

Prema zastupljenosti u ljudskom organizmu zauzima peto mjesto, odmah nakon kisika, ugljika, dušika i vodika, što iznosi oko 1,9 % tjelesne težine. Kod životinja kalcij zajedno s fosforom čini 65-75% svih mineralnih tvari u tijelu, odnosno to iznosi 2% od ukupne tjelesne mase životinje. U obliku karbonata nalazi se u ljuskama jaja, u ljušturama i kosturima mnogih morskih organizama, u biserju i koraljima, a kao hidroksiapatit u zubima i kostima. (Filipović, Lipanović 1995., Domaćinović 2006., FAO/WHO 2001.).

1.2. METABOLIZAM KALCIJA

1.2.1 Prijenos kalcija kroz staničnu membranu

Stanična membrana je građena od lipidnog dvosloja. Prijenos lipidnim dvoslojem vrši se putem difuzije ili aktivnim transportom. Brzina transporta određene tvari ovisi o topivosti te tvari u lipidima. Kalcij se u stanici nalazi u obliku iona. Ioni sporo prolaze lipidnim dvoslojem, te se za transport koriste bjelančevinasti kanali. Razlog iz kojeg ioni sporo prolaze lipidnim dvoslojem je njihov električni naboj. Prijenos kalcija u stanici vrši se primarnim aktivnim prijenosom, odnosno za prijenos kalcija u organizmu potrebna je energija u obliku ATP-a. Kalcijske crpke održavaju koncentraciju kalcija u stanici u stalnoj ravnoteži. U citosolu je koncentracija kalcija 10000 puta manja od one u izvanstaničnoj tekućini. Jedna kalcijska crpka nalazi se na staničnoj membrani i izbacuje kalcij iz stanice. Druga crpka ubacuje kalcijeve ione u unutrašnje stanične mjehuraste organele, kao što je sarkoplazmatski retikulum u mišićnoj stanici ili mitohondrije svih stanica. Bjelančevinasti nosač koji se proteže od jedne do druge strane membrane služi kao ATP-aza koja vrši razgradnju adenozin- trifosfata (ATP) u adenozin- difosfat (ADP). Dolazi do oslobađanja energije iz energijom bogate fosfatne veze. Uslijede konformacijske promjene i oslobađanja kalcija s njegovog veznog mjesta na bjelančevinastom nosaču. Osim kalcijevom crpkom, kalcijevi ioni se prenose i putem Na^{+}/Ca^{2+} antiportera koji transpotira kalcijeve ione iz stanice, a natrijeve ione u stanicu (Guyton, 1995.).

1.2.2 Skladištenje

Sarkoplazmatski retikulum je spremnik kalcijevih iona. Tijekom mirovanja kalcijevi ioni su povučeni u sarkoplazmatski retikulum aktivnim transportom. Crpka s pogonom na ATP smanjuje koncentraciju kalcijevih iona u citoplazmi mišića tijekom mirovanja na manje od 10^{-6} mol/L i povećava razinu tog iona unutar sarkoplazmatskog retikuluma na više od 10^{-3} mol/L. Unutar retikuluma kalcijevi ioni se vežu na protein kalsekvestrin koji sadrži više od 40 veznih mjesta za taj ion. Naglo ispuštanje kalcijevih iona iz prostora sarkoplazmatskog retikuluma

uslijedi nakon depolarizacije membrana T- tubula. Nakon toga dolazi do vezivanja kalcija na TnC komponentu tropinskog kompleksa što potiče kontrakciju mišića (Stryer, 1991.).

1.2.3 Apsorpcija kalcija

Iskoristivost kalcija koji hranom dospijeva u probavni trakt vrlo je slaba. Uzrok tomu je razmjerna netopivost njegovih spojeva, a i dvovalentni kationi se slabo apsorbiraju kroz crijevnu sluznicu. U crijevima kalcij nastoji stvarati gotovo netopljive spojeve kalcijeva fosfata, koji se ne apsorbiraju nego prolaze kroz crijeva te se izlučuju izmetom. Veliku ulogu kalcij ima i na apsorpciju fosfata, jer ukoliko se apsorbira kalcij, apsorbirat će se i fosfat. Oko sedam osmina dnevno unesenog kalcija ne apsorbira se, nego se izlučuje izmetom; preostala osmina se konačno izlučuje mokraćom. Vitamin D ima važnu ulogu u povećanju apsorpcije kalcija iz probavnog sustava, te pri odlaganju i apsorpciji kalcija u kosti. Aktivni proizvod vitamina D koji pomaže pri apsorpciji kalcija je 1,25- dihidroksikolekalciferol, a nastaje iz kolekalciferol, kojeg nazivamo vitaminom D_3. Najveći dio vitamina D_3 nastaje u koži kao posljedica zračenja 7-dehidrokolesterola ultraljubičastim sunčanim svjetlom. Iz tog razloga prikladno izlaganje suncu spriječiti će nedostatak vitamina D u organizmu. Aktivni oblik vitamina D; 1,25-dihidroksikolekalciferol nastaje u bubrezima pod nadzorom paratireoidnog hormona. Najvažniji način na koji 1,25- dihidroksikolekaliferol djeluje na pospješivanje apsorpcije kalcija je poticanje stvaranja bjelančevine koja veže kalcij u epitelnim crijevnim stanicama. Čini se da je količina apsorbiranog kalcija upravo razmjerna količini te bjelančevine. Bjelančevina ostaje u stanicama čak i nekoliko tjedana nakon što se iz organizma ukloni 1,25- dihidroksikolekalciferol, pa je tako djelovanje na apsorpciju kalcija trajnije. Ostali načini pospješivanja apsorpcije kalcija 1,25-dihidroksikolekalciferola su: stvaranje kalcijem stimulirane ATP-aze u četkastoj prevlaci epitelnih stanica, te stvaranje alkalne fosfataze u epitelnim stanicama. Lučenje paratireoidnog hormona je zakočeno povećanjem koncentracije kalcijevih iona, što za posljedicu ima nemogućnost tvorbe 1,25- dihidroksikolekalciferola u bubregu. Mehanizam negativne povratne sprege kontrolira koncentraciju 1,25- dihidroksikolekalciferola i kalcijevih iona u plazmi. To znači da porast koncentracije kalcijevih iona smanjuje paratireoidno lučenje, to smanjuje razinu

1,25- dihidroksikolekalciferola, a time se smanjuje apsorpcija kalcija iz probavnog sustava i tako koncentracija kalcija vraća na normalnu vrijednost.

Hormon kalcitonin smanjuje koncentraciju iona kalcija u krvi. Luči ga štitasta žlijezda iz parafolikularnih stanica ili stanica C, smještenih u intersticijskom tkivu između folikula. U mladih životinja kalcitonin vrlo brzo smanjuje koncentraciju kalcija u krvi, počinje djelovati nekoliko minuta nakon uštrcavanja. Povišenje koncentracije kalcija u plazmi od oko 10% uzrokovat će odmah 3-6 puta veću sekreciju kalcitonina. Mehanizam djelovanja je suprotan od onog kod paratireoidnog hormona. To znači da povišena koncentracija kalcija potiče pojačano lučenje kalcitonina, a povišena koncentracija kalcitonina smanjuje koncentraciju kalcija u plazmi na normalne vrijednosti. Postoje dvije razlika u mehanizmima djelovanja paratireoidnog hormona i kalcitonina. Kalcitoninski mehanizam djeluje brže i svoj maksimum doseže za manje od jednog sata, dok je kod paratireoidnog hormona nakon početka lučenja potrebno 3-4 sata kako bi se postigla najveća aktivnost. Druga je razlika što kalcitoninski mehanizam djeluje uglavnom kao kratkoročni regulator, suprotno snažnom dugotrajnom učinku što ga ima sustav paratireodinog hormona. Prema tome, u tijeku dužeg razdoblja paratireoidni hormon gotovo posve sam prilagođava razinu kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini (Guyton, 1995.).

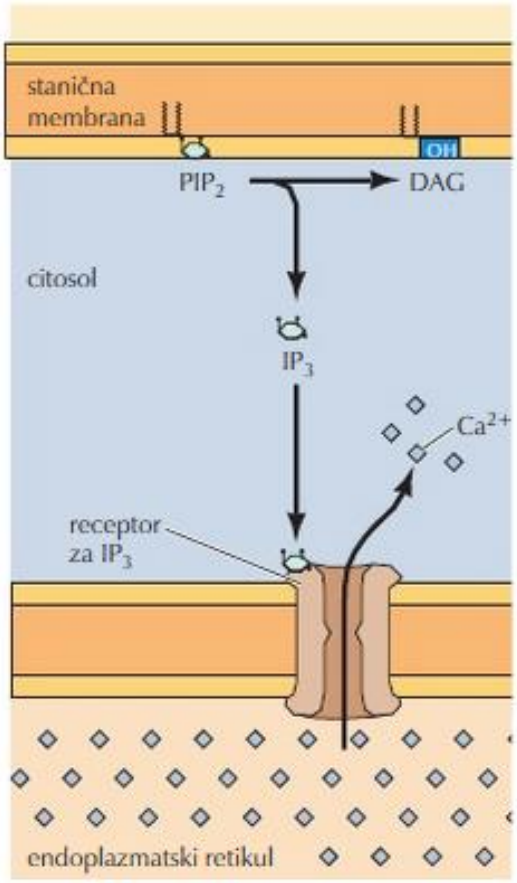
1.3. FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU

Kalcij se u životinjskom organizmu nalazi gotovo u cijelosti u anorganskom obliku. On predstavlja oko 1/3 od ukupne mase obezmašćenih i suhih kostiju. Prosječan sastav pepela u kostima je 360 g Ca/kg. Većina kalcija se nalazi u kosti i zubima (oko 99%) u obliku hidroksiapatita ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$), dok se ostatak od 1% nalazi u drugim stanicama i tkivima organizma. Osim što kalcij služi kao gradivni elementi kostura, kosti služe i kao rezerva kalcija u organizmu koja se po potrebi mobilizira i vraća u krv. Ispitivanjem na izotopima dokazano je da se između krvi i kosti neprestano događa izmjena kalcija. U staničnim membranama kalcija je važan za transport tvari i propusnost membrane. Stimuliranje sinteze acetilkolina potiče aktivnost živčanog sustava pri prijenosu podražaja. Kalcij aktivira pojedine enzimatske sustave važne za kontrakciju glatkih i poprečno- prugastih mišića, kao i aktivnost tripsina u tankom crijevu.

Sudjeluje u zgrušavanju krvi, a u krvi je značajan pri regulaciji reakcije krvi i tkivnih sokova (Domaćinović, 2006.).

1.3.1 Stanična signalizacija

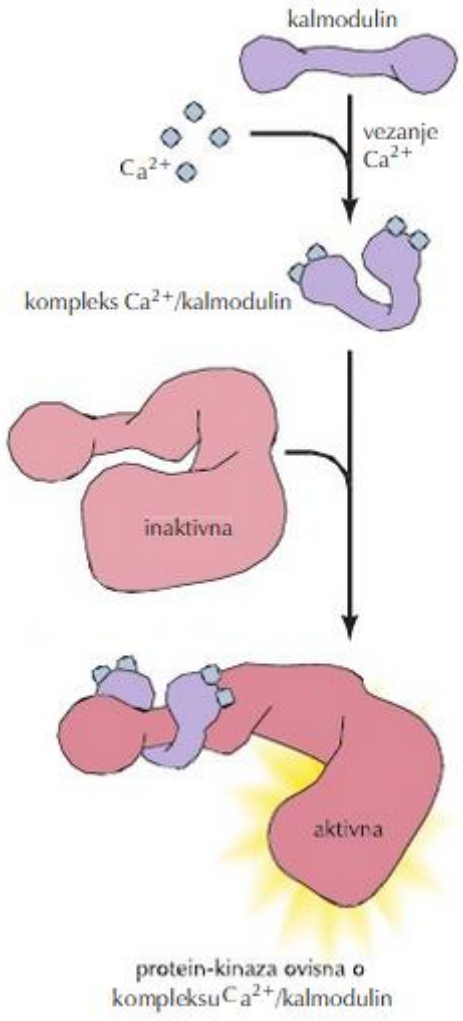
Uporaba sekundarnog glasnika koji potječe od membranskog fosfolipida fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfata (PIP_2), jedna je od najraširenijih putova unutarstaničnog signaliziranja. Različiti hormoni i faktori rasta potiču hidrolizu PIP_2 aktivacijom fosfolipaze C. U toj reakciji nastaju dva različita sekundarna glasnika: diacil-glicerol i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3). IP_3 je polarni sekundarni glasnik koji se otpušta u citosol, gdje djeluje tako da potiče otpuštanje kalcija iz unutarstaničnih spremnika. IP_3 djeluje tako da se veže za receptore koji su kalcijevi kanali upravljani ligandom, što uzrokuje otpuštanje kalcija iz endoplazmatskog retikuluma. Zbog toga djelovanja, unutarstanična razina kalcija raste na približno 1 μM, što utječe na aktivnost različitih ciljnih proteina, kao što su protein-kinaze i fosfataze. Intracelularni protein koji veže kalcij kalmodulin posrednik je u mnogim učincima kalcija, jer mu omogućava kretnje iz jednog dijela stanice u drugi. Kalmodulin sadrži četiri vezna mjesta za kalcij, a aktivacija kalmodulina uslijedi nakon što se koncentracija kalcija poveća na približno 0.5 μM. Kompleks kalcija/kalmodulina zatim se veže na različite ciljne proteine, uključujući protein- kinaze. CaM- kinaze se aktiviraju pomoću kalcij/kalmodulin kompleksa, a one fosforiliraju brojne druge proteine, kao što su metabolički enzimi, ionski kanali i transkripcijski faktori. Primjeri regulacije pomoću kompleksa kalcij/kalmodulina su adenil-ciklaza i fosfodiesteraza, regulacija kalcijevih kanala s pomoću



Slika 1: Mobilizacija kalcija pomoću IP_3

cAMPA-a, te fosforilacija brojnih ciljnih proteina s pomoću protein-kinaze A i protein-kinaza koje su ovisne o kompleksu kalcij/kalmodulin (Cooper, 2004.).

Kalcij također ima utjecaja na pukotinski spoj. Pukotinski spoj (gap junction) je vodeni kanal u eukariota poznat još i kao kanal stanica- stanica jer služi kao put za prolaz između unutrašnjosti mnogih stanica koje se dodiruju. Propusnost pukotinskih spojeva regulirana je koncentracijom kalcijevih iona. Porast intracelularne koncentracije Ca^{2+} iona uzrokuje postupno zatvaranje tih spojeva. Kad je koncentracija Ca^{2+} manja od 10^{-7} mol/L, kanali su potpuno otvoreni; pri koncentracijama višim od 5×10^{-5} mol/L kanali su zatvoreni. S porastom koncentracije kalcijeva iona između tih krajnjih vrijednosti, efektivni promjer pukotinskih spojeva smanjuje se tako da one najprije postanu nepropusne za veće molekule. Pukotinski spoj se sastoji od dviju nasuprotnih cilindričnih jedinica zvanih koneksoni, a konekson se sastoji od šest podjedinica. Konformacijske promjene u vidu klizanja i zakretanja vrše upravo kalcijevi ioni, a rezultat je otvaranje i zatvaranje pukotinskih spojeva (Stryer, 1991).



Slika 1. Kalmodulin ima oblik bučice s četiri vezna mjesta za kalcij

1.3.2 Prijenos živčanog podražaja

Kalcij ima važnu ulogu u prijenosu živčanog podražaja gdje utječe na otpuštanje acetilkolina. Acetilkolin je neurotransmiter koji omogućava komunikaciju između živčanih stanica, odnosno sinapsi. Otpuštanje acetilkolina električki je kontroliran oblik izlučivanja (sekrecije), a ovisi o prisutnosti Ca^{2+} iona u izvanstaničnoj tekućini. Depolarizacija presinaptičke

membrane dovodi do ulaska Ca^{2+} iona, što potiče prolazno stapanje (fuziju) membrane sinaptičke vezikule i presinaptičke membrane (Stryer, 1991).

1.3.3 Kontrakcija mišića

U mišićnoj stanici kalcijevi ioni su fiziološki regulatori kontrakcije. Na interakciju aktina i miozina u mišiću djeluju tropomiozin i troponinski kompleks smješteni u tankom vlakancu mišića. Troponin je kompleks od tri polipeptidna lanca: TnC, TnT TnI. Na TnC se vežu kalcijevi ioni. Ukoliko ioni kalcija nisu prisutni u mišiću tropomiozin i troponinski kompleks inhibiraju interakciju aktina i miozina, te na taj način priječe kontrakciju mišića. Tropomiozin sterički blokira vezivna mjesta na S1- domenu na aktinskim jedinicama. Živčano podraživanje potiče otpuštanje kalcijevih iona iz sarkoplazmatskog retikuluma. Otpušteni kalcijevi ioni se vežu na TnC komponentu troponina i uzrokuju konformacijske promjene, gdje se tropomiozin pomiče prema središtu dugog uzvojitog žlijeba tankog vlakanca. Tada S1- glave molekule miozina mogu stupiti u vezu s aktinskim jedinicama tankog vlakanca. Dolazi do hidrolize ATP-a i stezanja mišića, dok se kalcijevi ioni ne uklone i tropomiozin opet ne blokira pristup S1 glavama (Guyton, 1995.).

1.3.4 Zgrušavanje krvi

Kalcij sudjeluje u procesu zgrušavanja krvi jer je potreban za aktivaciju nekoliko faktora zgrušavanja koji su ovisni o vitaminu K. Zgrušavanje krvi zbiva se u tri bitna stadija: 1) stvaranje protrombinskog aktivatora, nakon prekidanja žile ili njezina oštećenja; 2) Protrombinski aktivator katalizira pretvorbu protrombina u trombin; 3) Trombin djeluje kao enzim pri pretvorbi fibrinogena u fibrinske niti koje u svoju mrežu upleću trombocite, krvne stanice i plazmu, stvarajući ugrušak. Faktor IV u zgrušavanju krvi je sam kalcij i potreban je za pokretanje svih reakcija prilikom zgrušavanja krvi. Služi za sintezu i aktivaciju protrombina (faktor II), prokonvertina (faktor VII), Christmas-ovog faktora (IX) te Stuart-Prower-ovog faktora (X), uz pomoć vitamina K. Vitamin K potreban je zbog procesa karboksilacije, ukoliko proteini nisu karboksilirani kalcij se ne može vezati na njih. Načina na koji vitamin djeluje proučavalo se

dodavanjem antagonista poput dikumarola. Dikumarol se nalazi u pokvarenoj djetelini i uzrokuje smrtonosna krvarenja stoke koja se njome hrani. Krave koje jedu dikumarol imaju nenormalni protrombin koji za razliku od normalnog ne veže kalcijeve ione (Stryer, 1991., Guyton, 1995.).

1.4 POREMEMEĆAJI UZROKOVANI MANJKOM ILI VIŠKOM KALCIJA

Koncentracija kalcija u organizmu tijekom homeostaze iznosi 9-12 mg u 100 ml krvne plazme. Ukoliko dođe do disbalansa u organizmu dolazi do pojave raznih stanja koja mogu biti jako štetna za životinju. Na nedostatak kalcija najviše su osjetljive visoko bređe životinje (blizanci), visoko mliječne krave u 3. laktaciji, kokoši nesilice i pomladak zbog brzog razvoja koštanog tkiva. Prvi pouzdan indikator nedostatka kalcija je smanjenje kalcija u krvi na manje od 8 mg/ 100 ml, a potom mobiliziranje rezervi iz cjevastih kostiju (Domaćinović, 2006).

Ukoliko kalcija nedostaje javlja se:

1. Rahitis
2. Osteomalacija
3. Osteoporoza
4. Mliječne groznica (kod krava)

Rahitis se uglavnom javlja kod mladih životinja zbog nedostatka kalcija ili fosfora u izvanstaničnoj tekućini. Obično je posljedica nedostatka vitamina D, a ne manjka kalcija i fosfora u hrani. Izrazito je važno izlaganje sunčevoj svjetlosti jer se pod utjecajem ultraljubičastih zraka stvara dovoljno vitamina D_3 (kolekalciferola) koji pospješuje apsorpciju kalcija i fosfora i na taj način sprječava pojavu rahitisa. Tijekom zimskih mjeseci nužno je hranom nadoknaditi vitamin D zbog nedostatka sunčeve svjetlosti. Vitamin D stvoren tijekom prethodnog ljeta može biti pohranjen u jetri nekoliko mjeseci, a i kalcij i fosfor moraju se nekoliko mjeseci apsorbirati iz kostiju prije nego postanu vidljivi klinički znakovi rahitisa. Rahitis se najviše javlja kod teladi i prasadi, a manifestira se usporenim rastom, iskrivljenjem kosti i odebljalim upaljenim zglobovima (Guyton 1995; Domaćinović 2006).

Osteomalacija se javlja kod starijih životinja gdje zbog demineralizacije kosti postaju meke i lomljive.

Osteoporoza je koštana bolest koja se javlja kod starijih životinja. Razlikuje se od osteomalacije i rahitisa, jer nastaje zbog manjka organskog koštanog matriksa, a ne zbog poremećene kalcifikacije kostiju. U osteoporozi je aktivnost osteoblasta obično smanjena, pa je zbog toga smanjeno i odlaganje osteoida u kosti. Najčešći uzroci nastanka osteoporoze su: pothranjenost, prestanak lučenja estrogena, te starost kada su uvelike smanjene količine hormona rasta i procesi u anabolizmu bjelančevina su slabi, pa se ne može stvarati dovoljno koštanog matriksa (Guyton 1995; Domaćinović 2006).

Mliječna groznica je nedostatak kalcija koji se manifestira kod mliječnih krava nakon partusa. Vanjski simptomi se odražavaju povećanom razdražljivošću, grčevitim pokretima, a kulminira komatoznim stanjem.

Ukoliko kalcija imamo u suvišku u organizmu javlja se hiperkalcemija.

Hiperkalcemija se javlja kada životinja hranom prima kalcij u suvišku. Organizam reagira tako da višak deponira u velike cjevaste kosti kao vlastitu rezervu. Tijekom povišene koncentracije kalcija u organizmu živčani sustav postane deprimiran, a refleksne aktivnosti središnjeg živčanog sustava usporene. Uzrokuje i opstipaciju, te gubitak teka, vjerojatno zbog smanjene kontraktilnosti mišića stjenke probavnog sustava. Ukoliko je razina kalcija drastično povećana pojavit će sklonost taloženja kalcijevih fosfata u krvi i u mekim tkivima, a taj učinak ubrzo može biti smrtonosan. Hiperkalcemija nepovoljno utječe na metabolizam i resorpciju drugih minerala, kao na primjer: mangana, magnezija, cinka, željeza, joda i bakra. Kod pilića brojlera hiperkalcemija izaziva depresiju rasta, a kod mladih kokoši nesilica dolazi do smanjenja nesivosti ako se koncentracija kalcija poveća do 40g/kg hrane (Guyton 1995; Domaćinović 2006).

1.5 MINERALNE TVARI KOD PERADI

Mineralne tvari imaju važnu ulogu u organizmu peradi. Važne su za metaboličke procese, sastavni su dio tjelesnih tkiva i proizvoda peradi. Deficit mineralnih tvari uzrokuje određene patološke promjene i pad proizvodnje. Organizam peradi sadrži oko 2,5 – 5% mineralnih tvari, a najveća količina je deponirana u kostima. Prosječno kokošje jaje od 62 g sadrži oko 6,7 g mineralnih tvari. Esencijalni minerali za perad su kalcij, fosfor, kalij, natrij, magnezij, mangan, jod, selen i cink. Prilikom izrade smjese za hranidbu peradi potrebno je posebnu pažnju posvetiti upravo tim mineralnim tvarima, kako ne bi došlo do deficita i pojave neželjenih stanja. Na iskorištavanje kalcija u hrani utječe pomanjkanje proteaza, prisutnost hitina i oksalne kiseline kao i suvišak fosfora (Kralik, 2008.).

1.5.1 Hranidba kalcijem

Odlaganje rezervi kalcija kreće dva tjedna prije nesenja kod mladih nesilica. Ukoliko dođe do nedostatka kalcija u hrani dolazi do pada proizvodnje jaja i kvalitete ljuske. Obrok koji ne sadrži kalcij kod peradi izaziva aktivaciju rezervi kalcija iz kosti, posebice iz rebara i prsne kosti. Kod nesilica potrebe za kalcijem ovise o intenzitetu nesivosti i broju jaja. Kalcij u obliku kalcijeva karbonata je glavni sastojak ljuske jaja, a ukupna količina kalcija u ljusci jajeta iznosi od 1,6 – 2,4 g. Kokoš koja godišnje nese 280 jaja izluči u njima oko 560 g kalcija, što je 22 puta više od količine koja se nalazi u njezinom organizmu. Pojava jaja s tankom ljuskom u proizvodnji može biti uzrokovana različitim čimbenicima, a najčešće je uzrokovana nedostatkom vitamina D ili smanjenom resorpcijom i iskorištavanjem kalcija iz pojedinih krmiva. Smjese za piliće trebaju sadržavati od 1,0 – 1,4% kalcija, što ovisi o fazi tova, kao i o energetskoj vrijednosti hrane. Za postizanje dobre kvalitete ljuske jajeta kod nesilica, preporučuje se da smjese sadržava od 2,2 – 2,5% kalcija. Postoje slučajevi gdje potrebe za kalcije mogu biti znatno veće, što se nadoknađuje posebnim dodavanjem različitih krmiva koja sadrže kalcij (Kralik, 2008.). Za pravilno iskorištavanje kalcija važnu ulogu ima i fosfor. Brojna istraživanja su dokazala da nije bitno zadovoljiti samo količinu ovih minerala, nego je jako bitan njihov međusobni odnos. Odnosi kalcija: fosforu ovise o vrsti životinje, njihovoj starosti, te intenzitetu proizvodnje. Tako kod

pilića u prirastu odnos iznosi 1-2 : 1, kod svinja 1 : 1,3, kod preživača 1 : 1,5, kod konja 1,5-2 : 1, a najširi je kod kokoši nesilica i iznosi 3-5 : 1 (Domaćinović, 2006.).

Izvor, veličina čestica i topljivost kalcija u želucu su faktori koji su predmet čestih istraživanja u hranidbi nesilica. Preporučeno je korištenje većih čestica kalcija u hranidbi zbog produljenog zadržavanja u želucu. Na taj način nesilice mogu iskorištavati kalcija tijekom noći kada je on potreban za formiranje ljuske jajeta. Minimalna veličina čestica trebala bi biti 1 mm, ukoliko je veličina čestica manja od 1 mm ne dolazi do njezina zadržavanja u želucu (Tunç, Cufadar, 2015.). Preporuka je također da smjesa kojom se hrane nesilice sadrži barem 25% kalcija iz krupnih čestica. Krmna smjesa koja sadrži dvije trećine velikih čestica kalcija posebice se preporučuje starijim nesilicama u trećoj fazi nesenja radi poboljšanja kvalitete ljuske jajeta (Lichovnikova, 2007.). Smanjenjem čestica vapnenca povećava se njegova topljivost. Topljivost kalcija iz različitih izvora također utječe na sposobnost nesilice za njegovo iskorištavanje, te na taj način topljivost kalcija utječe na kvalitetu ljuske i kostiju. Ukoliko je topljivost kalcija manja duži je period dostupnosti kalcija tijekom noćnih sati kada postoji osobita potreba za kalcijem zbog formiranja ljuske jajeta i na taj način smanjena je mobilizacija kalcija iz kostiju nesilica. S tim u vezi istraživači su izvijestili kako je ljuska kamenica bolja u hranidbi nesilica, jer ima manju topljivost od vapnenca (Olgun, 2015.). Na količinu zadržavanja kalcija u želucu osim veličine čestica utječe hranidbeni unos kalcija. Iako je vrlo važno unositi kalcij hranom, ne treba pretjerivati jer prekomjerni unos može uzrokovati smanjeni unos hrane. Kao najčešći izvor kalcija u hranidbi nesilica koristi se vapnenac i ljuska kamenica. Vapnenac i ljuska kamenica sadrže kalcij u obliku kalcijeva karbonata i svaki sadržava oko 38% kalcija. Bitna razlika između vapnenca i ljuske kamenica je cijena, naime cijena ljuske kamenica bitno je veća od vapnenca (Tunç, Cufadar, 2015.). Istraživanja su pokazala da zamjena vapnenca s ljuskama kamenica u određenom omjeru ima pozitivne učinke na kvalitetu ljuske jajeta. Velike količine kalcija kod nesilica potrebne su u ranim jutarnjim i kasnim poslijepodnevnim satima stoga ja vrijeme uzimanja bitan faktor. Vjeruje se da vrijeme predstavlja tako bitan faktor iz razloga što nesilica ne može zadržati dovoljne količine kalcija u tankom crijevu tijekom perioda formiranja ljuske. Utvrđeno je da najveći nedostatak kalcija u probavnom sustavu nesilica između 00-4 h . Razlog tomu je što se u ranim jutarnjim satima događa vrlo brza kalcifikacija ljuske (Ahmad 2004;

Pelicia 2009.). Nedostatak kalcija u ranim jutarnjim sati pokušava se nadoknaditi takozvanim noćim hranjenjem, gdje se kratkotrajnim prekidima mraka u objektu stimulira nesilice na uzimanje hrane (Vitorović, 2004.).

1.5.2 Ljuska jajeta kao izvor kalcija

Ljuska jajeta kokoši otpadni je materijal koji dolazi iz različitih izvora kao što su: farme peradi, valionice, tvornice za proizvodnju jaja, restorani i domaćinstva. Neki od načina na koje se iskorištava ljuska jajeta su: korištenje ljuske jajeta u prahu kao stabilizirajući materijal za poboljšanje svojstava tla, kao izvor kalcija u smjesama za svinje, te kao izvor kalcija za prehranu ljudi. Ukoliko se ljuska jajeta koristi u prehrani potrebno ju je sterilizirati, kako bi se uklonili patogeni mikroorganizmi (Gongruttananun, 2011.). Ljuska jajeta također se pokazala dobra alternativa za hranidbu nesilica, s približno istim udjelom kalcijeva karbonata kao ljuska kamenica i vapnenac (38%). (Tunç, Cufadar 2015.).

1.5.3 Kalcij i kvaliteta ljuske jajeta

Glavna funkcija ljuske jajeta je zaštita osjetljivog unutarnjeg sadržaja (bjelanjka i žumanjka) od nepovoljnih vanjskih utjecaja, a da pri tome omogućuje izmjenu plinova i prijenos topline. Ljuska jajeta mora biti dovoljno snažna da izdrži proces leženja, prikupljanja, razvrstavanja i transporta (Pizzolante 2009; Trpčić 2010.). Kvaliteta ljuske predstavlja važan faktor u proizvodnji jaja. Prilikom transporta od presudne je važnosti da je ljuska što otpornija na vanjske faktore koji je mogu ugroziti. Slomljena ili napuknuta jaja ne dolaze na tržište, te uzgajivačima predstavljaju ekonomski gubitak. 6-10% svih proizvedenih jaja je neupotrebljivo zbog problema vezanih uz kvalitetu ljuske (Swiatkiewicz, 2015.). Prema procjenama studija loša kvaliteta ljuske je predstavljala glavni ekonomski problem komercijalnim proizvođačima jaja s procijenjenim godišnjim gubitkom od oko 478 milijuna $ (Ahmad 2004.).

Formiranje jajeta kompleksan je proces koji se odvija u reproduktivnom sustavu kokoši, točnije u jajniku i jajovodu kokoši. Na njega utječu vanjski i unutrašnji čimbenici, pri čemu najvažniju

ulogu ima neurohormonalni kompleks kokoši. Zreli jajnik ima nekoliko folikula u različitim razvojnim stadijima, a iz najvećeg folikula nastat će jaje. Spolni trakt kokoši sastoji se od pet dijelova: infudibulum, magnum i isthmus te uterus i vagina, koji prelazi u kloaku. Žumanjku je potrebno 23-26 sati da prođe kroz jajovod, gdje se na njega talože pojedini dijelovi jajeta. U infudibulumu se jaje zadržava 15-30 minuta gdje ga oplođuje spermatozoid dopremljen iz kolake. U magnumu se tijekom 3-4 sata istalože cjelokupne bjelančevine bjelanjka. Jajčane opne dobiva u isthmusu gdje se zadržava 1 h i 15 minuta. U uterusu dolazi do taloženja mineralnih tvari i formiranje ljuske jajeta. U ovom stadiju se jaje najduže zadržava od 18-20 h, te su i potrebe za kalcijev najveće zbog sastava ljuske (otprilike 95% kalcijeva karbonata i 5% organskog materijala). Nakon što je ljuska jajeta formirana preko nje se odlaže zaštitni sloj nazvan kutikula. Polaganje jajeta izazvano je hormonalnim kontrakcijama maternice, uz pomoć mišića vagine i mišića trbušno grudne stjenke. Jaje prolazi kroz vaginu i izlazi preko kloake. Nakon pola sata dolazi do sljedeće ovulacije i započinje novi proces formiranja jajeta (Nemanić 1995, Taylor 1970.).

U posljednjih nekoliko desetaka godina mnogo se saznalo o faktorima koji su bitni za kvalitetu ljuske jajeta. Tijekom tog perioda mnogo se toga promijenilo, od genetike i hranidbe peradi, pa sve do načina držanja i praksa upravljanja (menadžment). Potrebno je neprestano raditi na poboljšanjima kvalitete ljuske kako bi što veći broj jaja stigao na tržište. Iako se na polju kvalitete ljuske i poboljšanja svojstava napravilo mnogo, još uvijek postoji mjesta za napredak. Problem predstavlja velik broj faktora koji utječu na kvalitetu same ljuske, te je nemoguće ispraviti sve nedostatke. Neki od faktora koji utječu na kvalitetu ljuske su: hranidba, zdravstveni problemi jata, praksa upravljanja (menadžment), uvjeti okoliša, uzgoj i stres (Butcher 1996.).

Kalcij ima važnu ulogu u čvrstoći ljuske jajeta. Sadržaj kalcija u ljusci jaja komercijalnih nesilica iznosi oko 2.2 g kalcija u obliku kalcij karbonata. Oko 95% suhe ljuske jajeta je kalcijev karbonat i teži oko 5.5 g. Prosječna ljuska sadrži oko 0.3 % fosfora i 3% magnezija, te u tragovima natrija, kalija, cinka, mangana, željeza i bakra. Ugradnja kalcija u ljusku jajeta genetički je određena i ograničena. Problem nastaje starenjem nesilica, koje tada nesu veća jaja, a otprilike ista količina kalcija se raspoređuje na veću površinu ljuske. Stoga je potrebna kontrola težine jajeta kako bi se dobila optimalna kvaliteta ljuske. Kontrola uzimanja hrane mijenjanjem temperature u smještaju

nesilica utječe na veličinu jajeta i na taj način se osigurava dostatna kvaliteta ljuske kod starijih nesilica (Butcher, 1996.). Uz kalcij, fosfor također ima važnu ulogu u formiranju ljuske iako je njegova prisutnost u ljuski uspoređujući s kalcijem mala (Ca:P=100:1). Mehanizam djelovanja fosfora na formiranje ljuske nije u potpunosti jasan. Smatra se da se višak fosfora akumulira u krvi i posreduje na mobilizaciju rezervi kalcijeva fosfata iz kosti ili postoji direktan antagonistički utjecaj fosfora u krvi na proces formiranja ljuske. Bez obzira na mehanizam djelovanja, nema sumnje da hranidbeni tretmani koji vode do povećanja fosfora u plazmi utječu na pad specifične težine jaja, a time i kvalitetu ljuske jajeta (Ahmad, 2004.).

Očita je potreba za adekvatnom hranidbom nesilica i nadoknadom kalcija, kako bi se održala potrebna kvaliteta ljuske. Obzirom da prosječna godišnja proizvodnja od 280 jaja zahtijeva 22 puta veću količinu kalcija nego što ga nesilica ima u svome organizmu, postaje nam jasno kako hranidba mora sadržavati veliku količinu kalcija. Tijekom 20 sati, koliko je potrebno za formiranje ljuske jajeta, svakih 15 minuta u jaje se ugrađuje 25 miligrama kalcija. To je količina kalcija koja se u svakom trenutku nalazi u cirkulacijskom sustavu nesilice. Problem se javlja i iz razloga što nesilica ne može 100% iskoristiti kalcij koji se nalazi u hrani. Stoga hrana za nesilice mora sadržavati više od 4 g kalcija dnevno. Hranidba koja sadrži visok udio fosfora i klora također može negativno utjecati na kvalitetu ljuske jajeta. Pretpostavlja se da fosfor i klor imaju negativan utjecaj na kvalitetu ljuske jajeta zbog utjecaja na acidobaznu ravnotežu (pH) u krvi. Esencijalnu ulogu u ispravnom iskorištavanju kalcija i fosfora naravno ima i vitamin D, ali suvišak vitamina D nije pokazao poboljšanje u kvaliteti ljuske jajeta u usporedi sa nesilicama koje su hranjene adekvatnom količinom vitamina D. Hranidba koja je sadržavala veće količine drugih vitamina i minerala nije pokazala nikakav utjecaj na poboljšanje kvalitete ljuske jajeta (Butcher, 1996.). U istraživanju gdje su korištena dodatna 2g vapnenca krupnih čestica po nesilici došlo je do statistički značajnog smanjenja deformacije ljuske, te su postignute veće vrijednosti sile loma i debljine ljuske (Vitorović, 2004.).

Kvalitetu ljuske određuju čvrstoća i debljina ljuske. Korelacijski koeficijent između ova dva svojstva je prema različitim autorima od 0,35 – 0,77. Debljina ljuske jajeta je manja na sredini nego na polovina te je potrebno naznačiti mjesto mjerenja. Debljina ljuske kokošjih jajeta varira između 0,24 i 0,43 mm. Starije nesilice nesu jaja s tanjom ljuskom od mlađih. Za normalno rukovanje i transport jaja potrebna je debljina ljuske 0,33 do 0,43 mm. Čvrstoća ljuske kod

kokošjih jaja kreće se između 3,0 – 3,5 kp, a starije kokoši nesu jaja slabije čvrstoće ljuske koja nekada iznosi i ispod 2,0 kp. Čvrstoća ljuske i debljina ljuske mjere se pomoću specijalnih instrumenata (Kralik, 2008.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja utvrditi utjecaj dodatka ljuske jajeta u hrani kokoši kao izvora kalcija, te njegove različite granulacije na koncentraciju kalcija u krvnom serumu.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na 75 ISA Hisex Brown kokoši nesilica, starosti 22 tjedna. Kokoši su slučajnim odabirom podijeljene u 5 skupina s obzirom na izvor kalcija u hrani i to: vapnenac, grubo mljevena ljuska jajeta, fino mljevena ljuska jajeta, smjesa fino mljevene ljuske jajeta i vapnenca 50: 50, te smjesa grubo mljevene ljuske jajeta i vapnenca 50:50. Kokoši su držane u kavezu po 3 jedinke u svakom, te pet ponavljanja po skupini. Uzorci krvi za analizu uzeti su punkcijom krilne vene od po jedne kokoši iz svakog kaveza u vakuum epruvete (3 ml) nakon 14. i 35. od početka uzimanja hrane. Nakon 20 minuta držanja na sobnoj temperaturi uzorci krvi su centrifugirani (5 min na 2500 rpm), te je odvojen krvni serum u kojem je određivana koncentracija kalcija. Koncentracija kalcija u krvnom serumu određene je koristeći automatski analizator Abott architect c4000.

Dobiveni rezultati su prikazani metodom deskriptivne statistike (PROC MEANS). Za analizu utjecaja izvora kalcija/tretmana na koncentraciju kalcija u serumu korištena je analiza varijance koristeći SAS statistički paket (PROC GLM). Razlike između tretmana provjeravane su pomoću Tukey provjere.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ukupno je analizirano 52 uzoraka krvi uzetih u dva navrata, dva tjedna nakon prilagodbe nesilica na hranu/tretman, te tri tjedna nakon prvog vađenja. Tijekom prvog vađenja uzeto je po 5 uzoraka krvi za svaki tretman, dok je za drugo vađenja broj varirao ovisno o tretmanu i kretao se između 2 i 7 jedinki. Srednja vrijednost, standardna devijacija, minimum i maksimum za sve tretmane prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Koncentracija kalcija u serumu kokoši nesilica u promatranom razdoblju (mmol/l)

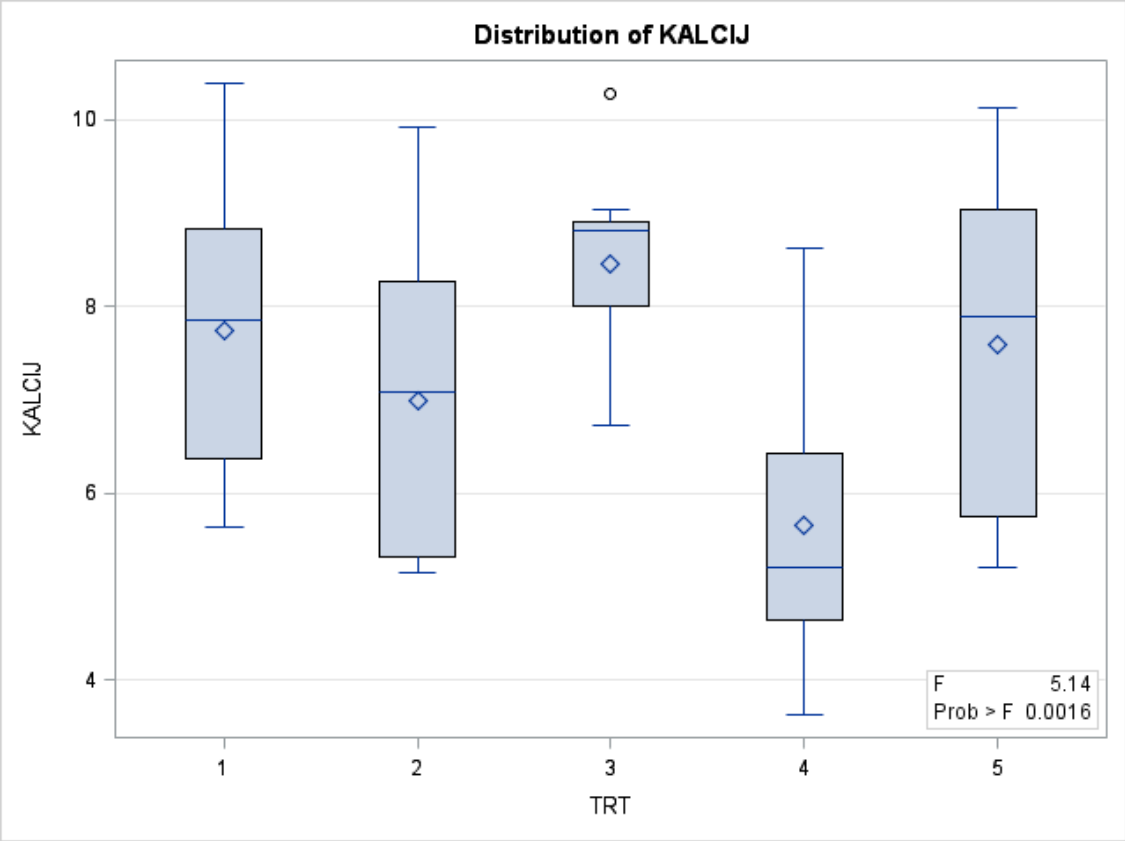
Red. br. Tretmana	Vađenje	Ukupan broj jedinki	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
TR1.	I	5	8.97	1.16	7.78	10.39
	II	7	6.86	1.17	5.64	8.80
TR2.	I	5	7.33	2.05	5.15	9.92
	II	7	6.73	1.38	5.28	8.76
TR3.	I	5	8.69	1.28	6.73	10.28
	II	4	8.15	0.92	6.90	8.90
TR4.	I	5	5.85	1.77	3.63	8.13
	II	7	5.51	1.42	4.47	8.62
TR5.	I	5	7.89	1.91	5.20	10.13
	II	2	6.82	1.50	5.76	7.89

* TR1- 100% vapnenac (kontrola); TR2- 100% grubo mljevene ljuske jajeta; TR3- 100% fino mljevene ljuske jajeta; TR4- fino mljevena ljuska jajeta i vapnenac u omjeru 50:50%; TR5- grubo mljevena ljuska jajeta i vapnenac u omjeru 50: 50%.

Kao što je vidljivo u tablici 1. prosječne koncentracije kalcija u krvi kokoši nesilica kretale su se od 5,85 do 8,97 mmol/l u prvom vađenju odnosno od 5,51 do 8,15 mmol/l u II. vađenju. U oba vađenja u kokoši koje su bile hranjene s dodatkom fino mljevene ljuske jajeta i vapnenca kao

izvora kalcija utvrđene su pojedinačno najniže vrijednosti kalcija u krvi (3,63 u I. vađenju i 4,47 u II. vađenju). S druge pak strane pojedinačno najveće vrijednosti kalcija u krvi zabilježene su kod kokoši koje su dobivale kao izvor kalcija vapnenac (10,39 mmol/l), zatim fino mljevenu ljusku jajeta (10,28 mmol/l) i smjesu grubo mljevene ljuske i vapnenca u istim omjerima (10,13 mmol/l).

Koristeći analizu varijance utvrđeno je da su razlike u koncentraciji kalcija u krvi kokoši nesilica statistički značajne, odnosno pod utjecajem različitih izvora kalcija u hrani (grafikon 1.).



Grafikon 1. Utjecaj tretmana na koncentraciju kalcija u krvi nesilica

Analizirajući varijabilnost unutar tretmana (grafikon 1.) vidljivo je da je ona bila najveća kod kokoši koje su u hrani dobivale grubo mljevenu ljusku jajeta (TR2), zatim kod onih hranjenih s smjesom grubo mljevene ljuske i vapnenca (TR5), te smjesom fino mljevene ljuske i vapnenca (TR4). Najmanja varijabilnost zabilježena je u kokoši hranjenih sa fino mljevenom ljuskom kao

izvorom kalcija (TR3). Nadalje, možemo se uočiti kako je koncentracija kalcija bila najmanja kod kokoši hranjenih smjesom fino mljevene ljuske i vapnenca (TR4).

Koristeći Tukey provjeru izvršena je analiza između kojih točno tretmana postoji značajna razlika (tablica 2.).

Tablica 2. Utjecaj izvora kalcija (tretmana) na koncentraciju kalcija u krvi kokoši nesilica

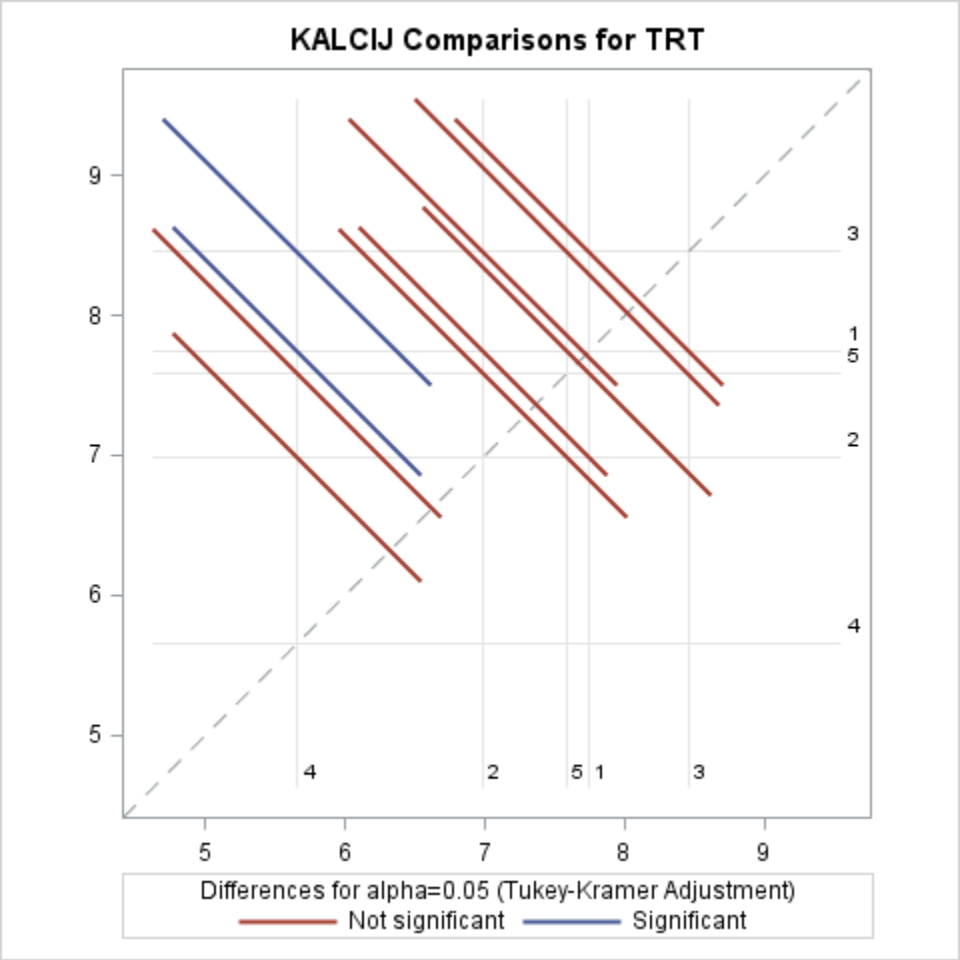
TRETMAN	LSM Mmol/l	Standardna greška
TR1.	7.74b	0.44
TR2.	6.98	0.44
TR3.	8.45b	0.50
TR4.	5.65a	0.44
TR5.	7.58	0.57

Nesilice hranjene smjesom sa 50% fino mljevene ljuske jajeta i 50 % vapnenca (TR4) imale su najniže koncentracije kalcija u krvi i značajno su se razlikovale od nesilica kod kojih je kao izvor kalcija korišten samo vapnenac (TR1) ili fino mljevena ljuska jajeta (TR3). U odnosu na ostala dva tretmana nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Jedan od razloga zbog kojih je koncentracija kalcija u krvi nesilica niža od ostalih je fino mljevena ljuska jajeta. Naime,već su mnoga istraživanja provedena vezana uz veličinu čestica kalcija, te zadržavanje istih u želucu. Dokazano je kako veće čestice kalcija omogućavaju duže zadržavanje u želucu i bolje iskorištavanje kalcija, posebice u večernjim satima. Tome u prilog govori i činjenica da su najsličnije vrijednosti kalcija u krvi imale kokoši nesilice koje su kao izvor kalcija u hrani koristile fino mljevenu ljusku jajeta.

Grafikon 2. vizualno prikazuje statističku razliku između tretmana. U koordinatnom sustavu označene su LSM vrijednosti svakog tretmana i međusobno uspoređene sa svakim tretmanom.

Plavom bojom označeni su tretmani koji se statistički međusobno razlikuju, dok su crvenom označeni tretmani koji se međusobno ne razlikuju.

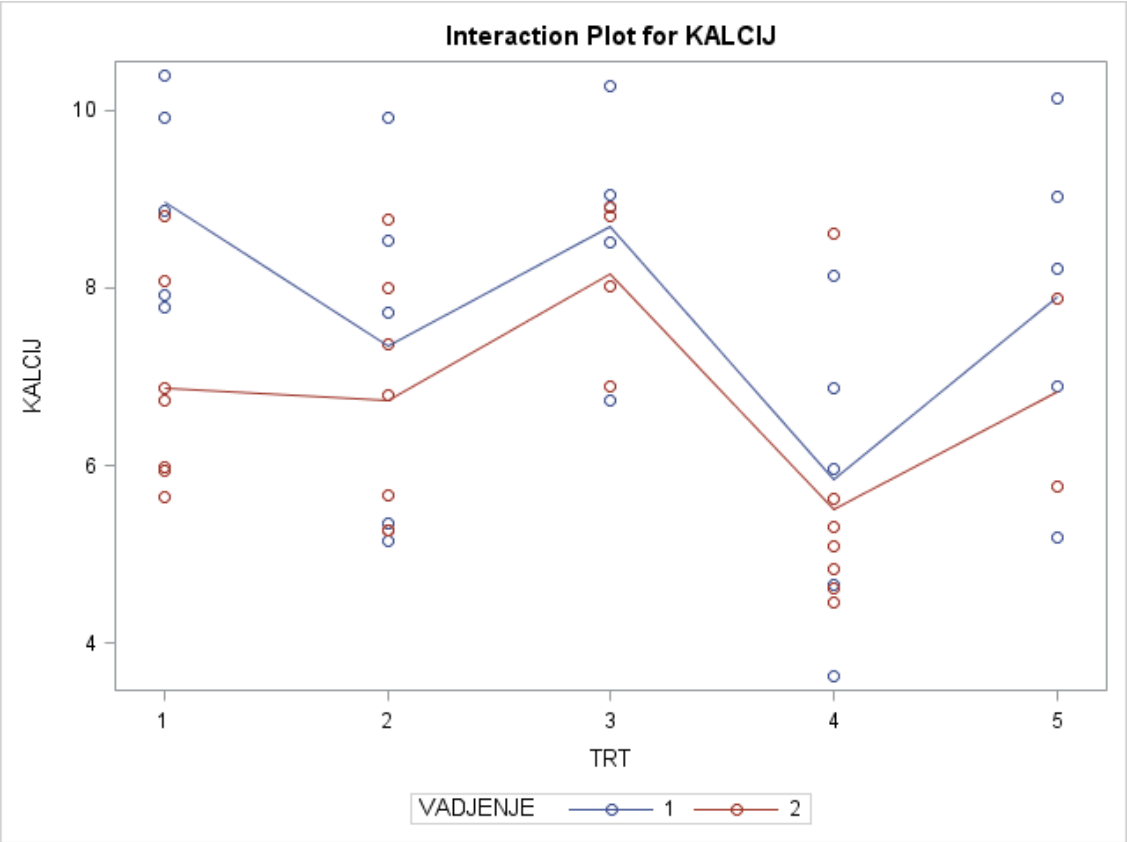


Grafikon 2. Utjecaj tretmana na koncentraciju kalcija u krvi kokoši nesilica

Rezultati ranijih istraživanja koji su istraživali mogućnost uporabe ljuske jajeta kao izvora kalcija za kokoši nesilice uglavnom su se odnosili na proizvodna svojstva i kakvoću ljuske odnosno jaja. Tako je u jednom istraživanju (Gongruttananun, 2011) koje je uključivalo 144 nesilica koje su hranjene trima tretmanima, od čega je jedan kontrolni i sadrži izvor kalcij u obliku finog

mljevenog vapnenca, dok su druga dva mješavina vapnenca i mljevene ljuske jajeta u omjeru 50: 50%, te treći sa 100% mljevene ljuske jajeta, utvrđeno da nema razlike između različito hranjenih nesilica u vidu tjelesne težine, proizvodnje jaja i težine jaja, te kvaliteti ljuske jaja. Razlika između tretmana također nije bilo niti u specifičnoj težini jajeta, plodnosti i leženju jaja. U istraživanju (Tunç, Cufadar 2015) koje je uključivalo 11 različitih tretmana (vapnenac velikih i malih čestica, ljuske kamenica velikih čestica i ljuske jajeta velikih čestica, te njihove međusobne kombinacije) nije utvrđen značajan učinak na težinu nesilica, proizvodnju jaja, masu jaja, unos hrane, konverziju hrane, specifičnu težinu jajeta, debljinu ljuske jajeta, silu loma jajeta. Jedini parametar koji je bio bitno različit, odnosno gdje su tretmani imali utjecaj bila je težina jajeta. Nesilice hranjene tretmanom mješavine finog i grubog vapnenca u omjeru 50: 50% imao je značajno najveću masu jajeta. U ovom istraživanju nisu analizirana proizvodna svojstva kao niti kvaliteta ljuske jajeta. Za očekivati je da razina cirkulirajuće količine kalcija u krvi u značajnoj mjeri utječe na odlaganje kalcija u ljusci jajeta. Samim time koncentracija kalcija u krvi bi posredno mogla imati i utjecaja na koncentraciju kalcija u ljusci odnosno utjecati na njenu čvrstoću. Olgun i sur. (2015.) analizirali su u svom istraživanju upotrebu ljuske jajeta i ljuske kamenica kao izvor kalcija u različitim omjerima s vapnencem kao najčešće upotrebljavanim izvorom kalcija. Tako je utvrđeno da u tretmanima s 1/3 i 2/3 ljuska kamenica je zabilježena najmanja masa jaja, te najlošije uzimanje hrane, uspoređujući s kontrolom. Lošije uzimanje hrane zabilježeno je i kod tretmana s 2/3 ljuske jajeta. Mješavina 1/3 ljuske jajeta i 1/3 ljuske kamenica bio je tretman s najvećom proizvodnjom jaja, dok je najveća masa i najbolja konverzija hrane bila u kontrolnoj grupi. Koncentracija kalcija u ljusci je također bila najviša kod tretmana s 1/3 ljuske jajeta. Kao zaključak navedeni autori navode da se ljuska jajeta se može koristiti kao alternativni oblik hranjenje nesilica, bez da utječe na svojstva proizvodnje i kvalitetu ljuske jajeta

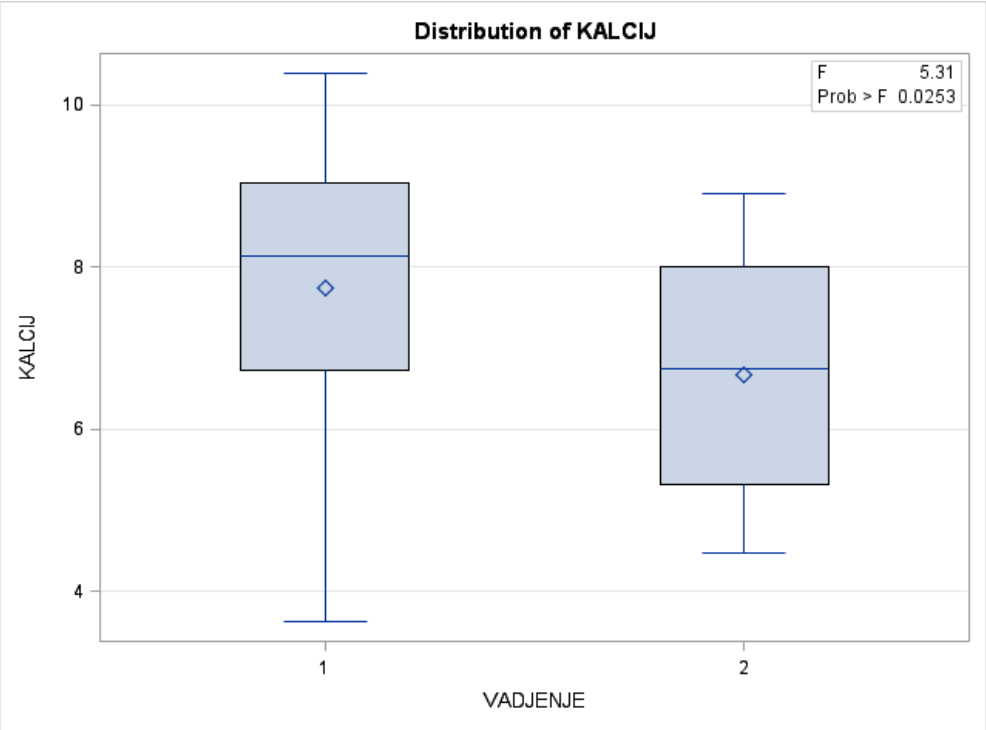
Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s obzirom na vrijeme uzorkovanja tj. koncentracije kalcija u krvi u I. vađenju (14. dan) i u II. vađenju (35. dan) može se uočiti da su veće vrijednosti zabilježene u I. vađenju bez obzira na izvor kalcija u hrani (Grafikon 3.). Plavom bojom označeni su rezultati prvog vađenja, dok su crvenom bojom označeni rezultati drugog vađenja. Plava linija označava prosječne vrijednosti prvog vađenja, dok crvena linija prikazuje prosječne vrijednosti drugog vađenja.



Grafikon 3. Raspodjela rezultata koncentracije kalcija u krvi kokoši nesilica 14. i 35. dan pokusa

Kako možemo vidjeti iz grafikona 3. najveće razlike u koncentraciji kalcija u krvi između prvog i drugog vađenja utvrđenja kod kokoši hranjenih vapnencem kod kojeg prosječna vrijednosti prvog vađenja iznosi 8.97 mmol/l, a kod drugog vađenja 6.86 mmol/l. Najmanja razlika između I. i II. vađenja zabilježena je kod kokoši nesilica koje su jele smjesu fino mljevene ljuske i vapnenca (5,85 vs. 5,51 mmol/l). To je ujedno i skupina kod koje su zabilježene najmanje vrijednosti koncentracije kalcija u krvi.

Grafikon 4. prikazuje statistiku za provjeru razlika između dvaju vađenja (15. i 35. dan).



Grafikon 4. Raspodjela koncentracije kalcija kod prvog i drugog vađenja

Kao što je vidljivo iz rezultata (grafikon 4.) vrijednosti koncentracije kalcija u krvi kokoši nesilica bile su veće u I. negoli u II. vađenju. Tako su prosječne izmjerene vrijednosti 15. dana (I. vađenje) iznosile 7,75 mmol/l, a 35-og dana 6,66 mmol/l (tablica 3). Navedeno se može dijelom objasniti činjenicom da su u pokusu korištene starije nesilice, koje fiziološki iskorištavaju manju količinu kalcija iz hrane, te posežu u većoj mjeri za rezervama kalcija u kostima, što se može odraziti i na nižu razinu cirkulirajućeg kalcija u krvi.

Tablica 3. Utjecaj vađenja na koncentraciju kalcija u krvi kokoši nesilica

Vađenje	LSM Mmol/l	Standardna greška
1.	7.75	0.33
2.	6.66	0.32

5. ZAKLJUČAK

Upotreba ljuske jajeta kao izvora kalcija u hrani kokoši nesilica nije imala značajnog utjecaja na koncentraciju kalcija u krvi. Tretmani koji su uključivali 100 % sitnu i 100% krupnu ljusku, te samo vapnenac i smjesu vapnenca i krupno mljevene ljuske jajeta u omjeru 50: 50 %, nisu pokazivali značajne razlike u koncentraciji kalcija u krvi.

Značajno niže vrijednosti koncentracije kalcija u krvi zabilježen je kod kokoši nesilica koje su bile hranjene smjesom vapnenca i sitno mljevene ljuske u omjeru 50: 50 %. Obzirom da tretman koji sadržava isti omjer vapnenca, ali ima veću veličinu čestica ne pokazuje niže vrijednosti, možemo zaključiti da veličina čestica igra ulogu u iskorištavanju kalcija iz hrane. Stoga se preporučuje da se u hrani kao izvor kalcija koristi ljuska jajeta s većom veličinom čestica što pridonosi duljem zadržavanju kalcija želucu i pospješuje njegova iskoristivost.

Ljuska jajeta kao nusproizvod u korištenju jaja može se koristiti kao izvor kalcija u hrani kao zamjena ili dopuna vapnencu kao najčešće korištenom izvoru kalcija u hrani kokoši nesilica. Nadalje, navedeno smanjuje i količinu otpada koja zaostaje prilikom korištenja i proizvodnje jaja što predstavlja ekološki vrlo prihvatljiv postupak.

.

6. LITERATURA

1. Filipović, I., Lipanović, S. (1995) Opća i anorganska kemija: II. Dio kemijski elementi i njihovi spojevi, Školska knjiga, Zagreb.
2. FAO/WHO (2001) Human Vitamin and Mineral Requirements, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y2809e/y2809e00.pdf>. Pristupljeno 20. kolovoza 2015.
3. Guyton A. C. (1994). Fiziologija čovjeka i mehanizam bolesti, Medicinska naklada, Zagreb
4. Stryer L. (1991). Biokemija, Školska knjiga, Zagreb
5. Cooper G. M., Hausman R. E. (2004). Stanica molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb
6. Domaćinović M. (2006). Hranidba domaćih životinja, Osnove hranidbe, Krmiva, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
7. Kralik G., Has-Schön E., Kralik,D., Šperanda M. (2008). Peradarstvo, biološki i zootehnički principi, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek
8. Tunç A. E., Cufadar Y. (2015). Effect of Calcium Sources and Particle Size on Performance and Eggshell Quality in Laying Hens, Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 3(4): 205-209
9. Roland, Sr. D.A. (1988.) Eggshell problems: Estimates of incidence and economic impact. Poult. Sci., 67: 1801-1803
10. Lichovnikova M. (2007). The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens, Br Poult Sci. vol.48 no.1:71-75.
11. Olgun O., Yildiz A. Ö., Cufadar Y. (2015). The effects of eggshell and oyster shell supplemental as calcium sources on performance, eggshell quality and mineral excretion in laying hens, Indian J. Anim. Res., 49 (2): 205-209
12. Ahmad H. A., Balander R. J. (2004). Physiological Response of Layers to Alternative Feeding Regimen of Calcium Source and Phosphorus Level, International Journal of Poultry Science 3 (2): 100-111

13. Butcher, G.D.(1996) Fact Sheet VM-69, a series of the Veterinary Medicine Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <//edis.ifas.ufl.edu/VM013>. Pristupljeno 25. kolovoza 2015.
14. Vitorović D. (2003). Čvrstoća ljuske jaja, Institute for Animal Husbandry Belgrade-Zemun.<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/14509156/2004/145091560404107V.pdf>. Pristupljeno 20. siječnja 2016.
15. Gongruttananun N. (2011). Effects of Using Ground Eggshells as a Dietary Calcium Source on Egg Production Traits, Hatching Performance and Eggshell Ultrastructure in Laying Hens, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 45 : 209 - 220
16. Pizzolante, C., E. Saldanha, C. Laganá, S. Kakimoto, and C. Togashi (2009). Effects of calcium levels and limestone particle size on the egg quality of semi heavy layers in their second production cycle. Braz. J. Poult. Sci. 11:79–86
17. Trpčić I. (2010). Mikrobiološka kakvoća i ocjena svježine konzumnih jaja, Meso, Vol. XII No. 5: 286 - 293
18. Świątkiewicz S., Arczewska-Włosek A., Krawczyk J., Puchała M., Józefiak D. (2015). Effects on performance and eggshell quality of particle size of calcium sources in laying hens diets with different Ca concentrations, Arch. Anim. Breed., 58, 301-307
19. Pelicia K., Garcia E., Móri C., Faitarone ABG., Silva A., Molino AB., Vercese F., Berto DA., (2009). Calcium Levels and Limestone Particle Size in the Diet of Commercial Layers at the End of the First Production Cycle, Pelicia, Rev. Bras. Cienc. Avic. vol.11 no.2: 87-94
20. Taylor T. G. (1970) How an Eggshell Is Made, Scientific American, 222:88-95.
21. Halls A. Egg Formation and Eggshell Quality in Layers , Amy Halls, Monogastric Nutritionist Shur-Gain, Nutreco Canada Inc. < http://www.nutrecocanada.com/docs/shur-gain---poultry/egg-formation-and-eggshell-quality-in-layers.pdf>. Pristupljeno 2.2.2016.
22. Nemanić J., Berić Ž. (1995). Peradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1995.