



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Slavko Žužul

**USPOREDBA UČINKA KONDENZIRANIH
(*QUEBRACHO*) I HIDROLIZIRAJUĆIH
(SLATKI KESTEN) TANINA NA
PROIZVODNE REZULTATE I PROBAVNI
SUSTAV TOVNIH PILIĆA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Slavko Žužul

**USPOREDBA UČINKA KONDENZIRANIH
(*QUEBRACHO*) I HIDROLIZIRAJUĆIH
(SLATKI KESTEN) TANINA NA
PROIZVODNE REZULTATE I PROBAVNI
SUSTAV TOVNIH PILIĆA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Kristina Starčević, izvanredna profesorica
dr. sc. Tomislav Mašek, redoviti profesor u trajnom izboru

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Slavko Žužul

**A COMPARISON OF THE EFFECT OF
CONDENSED (QUEBRACHO) AND
HYDROLYSABLE (SWEET CHESTNUT)
TANNINS ON PRODUCTION RESULTS
AND THE GASTROINTESTINAL TRACT
OF BROILERS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Kristina Starčević, PhD, Associate Professor

Tomislav Mašek, PhD, Full Professor

Zagreb, 2026



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Slavko Žužul, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2026.

Doktorski rad izrađen je u

Zavodu za kemiju i biokemiju

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

i

Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: prof. dr. sc. Renata Barić-Rafaj

Predstojnik: prof. dr. sc. Hrvoje Valpotić

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Animalna proizvodnja i biotehnologija.

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem dragim mentorima, izv. prof. dr. sc. Kristini Starčević i prof. dr. sc. Tomislavu Mašku koji su me tijekom izrade ove disertacije znanstveno i stručno usmjeravali te bili uz mene i u teškim i u lijepim trenucima studija.

Posebno zahvaljujem višoj asistentici, dr. sc. Ivani Sabolek, dr. med. vet., koja mi je uvelike pomogla u organizaciji ovog znanstvenog istraživanja te mi je praktičnim i znanstvenim savjetima pomagala tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su mi na bilo koji način pomogli prilikom izrade ove disertacije.

Velika hvala gospodinu Đuri Saboleku iz Dekanovca i njegovoj obitelji, na čijem je OPG-u provedeno ovo znanstveno istraživanje.

Posebna hvala mom prijatelju i susjedu Ivanu Gudelju – Ivanici, dr. med. vet., i njegovoj obitelji, koji su mi omogućili prvi doticaj s veterinarskom strukom.

Zahvaljujem kolegama iz Sandoza koji su uvijek bili spremni pomoći mi u izvršavanju radnih zadataka kada bih morao izostati zbog obveza na doktorskom studiju, posebice mojim terenskim kolegicama Mireli Gudelj i Mariji Juras.

Velika hvala svim mojim kumovima i prijateljima s kojima sam dijelio i dobre i loše trenutke tijekom života, kao i izrade ovog dokorskog rada.

Posebnu zahvalnost za podršku, strpljenje i usmjeravanje na pravi put dugujem mami, tati i sestrama. Hvala vam na svemu.

Najveću zahvalu iskazujem dragom Bogu na svim dobrim ljudima kojima me okružio.

Slavko

O MENTORIMA

Kristina Starčević rođena je 6. prosinca 1970. godine u Münchenu. Diplomirala je 1995. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na kojem je nastavila poslijediplomski znanstveni studij Inženjerska kemija te 2001. godine stekla akademski stupanj magistra znanosti. Doktorirala je 2005. godine iz područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja kemije, grane organske kemije. Od prosinca 1995. do siječnja 2007. godine bila je zaposlena u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije kao znanstvena novakinja na projektu prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola. U razdoblju od 2007. do 2010. godine radila je u istraživačkom centru tvrtke GlaxoSmithKline Research Centre Zagreb d.o.o. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu zaposlena je od 2010. godine, najprije u Zavodu za stočarstvo, potom u Zavodu za sudsko i upravno veterinarstvo, a od veljače 2019. godine radi u Zavodu za kemiju i biokemiju u kojem obnaša dužnost izvanredne profesorice. Aktivno sudjeluje u nastavi na integriranom preddiplomskom i diplomskom te specijalističkim studijima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je članica Povjerenstva za upravljanje kvalitetom i Vijeća doktorskog studija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je nagrade GSK R&D's Exceptional Science Award Programme (2008.) te Nagrade Veterinarskog fakulteta za znanstveni rad (2018.).

Znanstveni interes Kristine Starčević usmjeren je na metabolizam lipida i masnih kiselina, oksidativni stres, upalne procese, antioksidativne mehanizme te dizajn i biološku evaluaciju bioaktivnih spojeva. Sudjelovala je kao suradnica na dva projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), bila je voditeljica dvaju HRZZ projekata te voditeljica jednog bilateralnog projekta. U navedenim područjima objavila je više od 80 radova u časopisima s međunarodnom recenzijom, dok njezina ukupna znanstvena bibliografija obuhvaća više od 170 znanstvenih i stručnih radova, uključujući izlaganja na međunarodnim kongresima. Autorica je dvaju međunarodnih patenata iz područja medicinske kemije i bioaktivnih spojeva. Aktivno sudjeluje u mentoriranju mladih istraživača; pod njezinim mentorstvom obranjena su dva doktorska rada, dok ih je pet u tijeku izrade, kao i veći broj diplomskih i završnih radova. Djeluje kao recenzentica u više međunarodnih znanstvenih časopisa te je članica Hrvatskog kemijskog društva i međunarodnog društva ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids).

OBJAVLJENI RELEVANTNI RADOVI U POSLJEDNJIH PET GODINA

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEIN, E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex differently influence fecal *Escherichia coli* count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. *J. Cent. Eur. Agric.* 26, 606-617.

DOI: 10.5513/JCEA01/26.3.4695

KRSTULOVIĆ, L., M. LEVENTIĆ, V. RASTIJA, **K. STARČEVIĆ**, M. JIROUŠ, I. JANIĆ, M. KARNAŠ, K. LASIĆ, M. BAJIĆ, LJ. GLAVAŠ-OBROVAC (2023): Novel 7-chloro-4-aminoquinoline-benzimidazole hybrids as inhibitors of cancer cells growth: synthesis, antiproliferative activity, in silico ADME predictions, and docking. *Molecules* 28, 540.

DOI: 10.3390/molecules28020

MAŠEK, T., P. ROŠKARIĆ, S., SERTIĆ, **K. STARČEVIĆ** (2025): Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Supplementation Could Attenuate Negative Effects of Maternal Metabolic Syndrome on Liver Lipid Metabolism and Liver Betacellulin Expression in Male and Female Rat Offspring. *Metabolites*, 15, 1; 32-43.

DOI: 10.3390/metabo15010032

PERIN, N., M. CINDRIĆ, P. VERVAEKE, S. LIEKENS, T. MAŠEK, **K. STARČEVIĆ**, M. HRANJEC (2021): Benzazole-substituted iminocoumarins as potential antioxidants with antiproliferative activity. *Med. Chem.* 17, 13–20.

DOI: 10.2174/1573406416666191218101427

ROŠKARIĆ, P., M. ŠPERANDA, T. MAŠEK, D. VERBANAC, **K. STARČEVIĆ** (2021): Low dietary n-6/n-3 ratio attenuates changes in NRF2 gene expression, lipid peroxidation, and inflammatory markers induced by fructose overconsumption in rat abdominal adipose tissue. *Antioxidants* 10, 2005.

DOI: 10.3390/antiox10122005

Tomislav Mašek rođen je 7. prosinca 1975. u Karlovcu. Osnovnu školu i Gimnaziju pohađao je u Karlovcu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1994. godine i na njemu diplomirao 2001. godine. Od 2001. do 2010. zaposlen je kao znanstveni novak asistent, od 2010. kao docent, 2015. kao izvanredni profesor, od 2019. kao redoviti profesor te od 2024. kao redoviti profesor u trajnom izboru u Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja. Također, izabran je u znanstveno zvanje znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju. Godine 2001. upisao je poslijediplomski studij, smjer fiziologija domaćih životinja, koji završava 2008. izradom doktorske disertacije naslova „Utjecaj žive kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ na proizvodnju i kakvoću mlijeka te neke biokemijske krvne pokazatelje mliječnih ovaca“. Kao nastavnik izvodi predavanja, seminare, vježbe, kolokvije te ispite studentima iz obveznih predmeta Primijenjena hranidba i Opća hranidba te izbornih predmeta Komparativna hranidba, Dijetetika životinja i Dodaci hrani za životinje – modulatori zdravlja. Na poslijediplomskom studiju izvodi nastavu iz predmeta Optimalizacija obroka i krmnih smjesa. Na specijalističkim studijima predaje predmete Hranidba životinja u sudskom veterinarstvu te Hranidba i dobrobit životinja.

Predavač je na tečajevima trajne edukacije za doktore veterinarske medicine Fiziologija probave, hranidba i metabolički poremećaji preživača te Prehrana i dijetetika laboratorijskih životinja. Također je predavač na edukaciji za veterinarske inspektore pri Upravi veterinarstva, Ministarstvo poljoprivrede, iz područja analize hrane za životinje i sigurnosti hrane za životinje. Mentor je 14 obranjenih diplomskih radova te trima obranjenim doktorskim radovima. Trenutno je mentor trima doktorandima. Sudjelovao je u većem broju kompetitivnih znanstvenih projekata, od čega se izdvajaju tri projekta Hrvatske zaklade za znanost i projekt Europskog fonda za regionalni razvoj. Sudjelovao je i na četiri VIP projekta i tri potpore Sveučilišta u Zagrebu. Autor je 85 znanstvenih radova (Scopus), 51 sažetka na skupovima, 12 cjelovitih radova u zbornicima skupova, šest poglavlja u knjigama te triju ostalih radova. Trenutno je stalni ili povremeni recenzent u 19 međunarodnih časopisa. Član je uredničkih odbora šest časopisa (Stočarstvo, Krmiva, Hrvatski veterinarski vjesnik, Veterinarska stanica, Veterinarski arhiv, Agriculture) te pomoćni urednik u časopisu Agriculture.

Član je Povjerenstva za statut Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Matičnog odbora za područje biomedicine i zdravstva – polje veterinarske medicine, te stručnog društva International society for the study of fatty acids and lipids.

Objavljeni relevantni radovi u posljednjih pet godina

MAŠEK, T., P. ROŠKARIĆ, S., SERTIĆ, K. STARČEVIĆ (2025): Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Supplementation Could Attenuate Negative Effects of Maternal Metabolic Syndrome on Liver Lipid Metabolism and Liver Betacellulin Expression in Male and Female Rat Offspring. *Metabolites*, 15, 1; 32-43.

DOI: 10.3390/metabo15010032

RUBIĆ, I., R. BURCHMORE, S. WEIDT, C. REGNAULT, J. KULEŠ, R. BARIĆ RAFAJ, **T. MAŠEK**, A. HORVATIĆ, M. CRNOGAJ, P. D. ECKERSALL, P. NOVAK, V. MRLJAK (2022): Multi-platform strategies and metabolomics approaches for the investigation of comprehensive metabolite profile in dogs with *Babesia canis* infection. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1575.

DOI: 10.3390/ijms23031575

ŠURAN, J., I. CEPANEC, **T. MAŠEK**, K. STARČEVIĆ, I. TLAK GAJGER, M. VRANJEŠ, B. RADIĆ, S. RADIĆ, I. KOSALEC, J. VLAINIĆ (2021): Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants* 10, 978.

DOI: 10.3390/antiox10060978

VRANIĆ, M., K. BOŠNJAK, G. KIŠ, **T. MAŠEK**, D. BROŽIĆ, A. NOVAK, K. KRAPINEC (2022): The effect of semi-natural grassland cutting height on the nutritive value of fermented forage. *ACS* 87, 253–258.

MAŠEK, T., J. BARIŠIĆ, V. MICEK, K. STARČEVIĆ (2020): Cafeteria diet and high-fructose rodent models of NAFLD differ in the metabolism of important PUFA and palmitoleic acid without additional influence of sex. *Nutrients* 12, 3339.

DOI: 10.3390/nu12113339

SAŽETAK

USPOREDBA UČINKA KONDENZIRANIH (QUEBRACHO) I HIDROLIZIRAJUĆIH (SLATKI KESTEN) TANINA NA PROIZVODNE REZULTATE I PROBAVNI SUSTAV TOVNIH PILIĆA

U uvjetima intenzivne peradarske proizvodnje, osobito nakon zabrane uporabe antibiotskih promotora rasta u Europskoj uniji, javlja se potreba za razvojem učinkovitih, sigurnih i održivih prehrambenih strategija koje osiguravaju očuvanje zdravlja i dobrobiti životinja te kvalitete proizvoda. Tanini su biljni polifenolni spojevi s izraženim bioaktivnim svojstvima čija se primjena u hranidbi peradi intenzivno istražuje. Budući da je njihovo djelovanje izrazito heterogeno i uvjetovano kemijskom strukturom, nužno je jasno razlikovati hidrolizirajuće (HT) i kondenzirane tanine (KT). Cilj ovog doktorskog rada bio je usporediti učinke HT podrijetlom iz kestena i KT podrijetlom iz quebracha na proizvodne rezultate, zdravlje probavnog sustava, antioksidativni i imunološki status te kvalitetu jestivih tkiva pilića u tovu.

Istraživanje je provedeno na 150 pilića hibrida Ross 308, raspoređenih u kontrolnu skupinu te dvije pokusne skupine hranjene obrocima s dodatkom 0,75 g/kg HT, odnosno KT tijekom standardnog tova u trajanju od 42 dana.

Rezultati su pokazali da HT, za razliku od KT, značajno poboljšavaju proizvodne pokazatelje, dok su oba tipa tanina povoljno utjecala na smanjenje koncentracije amonijaka, vlagu stelje i pojavnost kontaktnih dermatitisa. Tanini su pokazali izražen antioksidativni učinak, očitovan smanjenjem koncentracije malondialdehida u serumu i tkivima. Nadalje, primjena tanina pozitivno je utjecala na crijevnu mikrobiotu, uključujući smanjenje broja *E. coli*, te na morfometriju crijeva povećanjem duljine i površine crijevnih resica. Zabilježen je i snažan protuupalni i imunomodulatorni učinak tanina, koji se očitovao smanjenjem ekspresije proupalnih citokina i povećanjem koncentracije sekretornog IgA u crijevima. Dobiveni rezultati potvrđuju da tanini predstavljaju funkcionalne dodatke hrani s potencijalom za poboljšanje zdravlja, dobrobiti i proizvodnosti tovnih pilića, pri čemu je potrebno uzeti u obzir njihovu vrstu, izvor i dozu primjene.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da HT poboljšavaju proizvodne rezultate kod tovnih pilića, dok obje vrste tanina povoljno djeluju na pojavnost kontaktnih dermatitisa, antioksidativni, protuupalni i imunomodulatorni status te morfometriju crijeva. Razlike u uočenim učincima upućuju na postojanje različitih mehanizama djelovanja i potrebu

za daljnjom optimizacijom njihove primjene uključujući iskorištavanje potencijalnog sinergističkog učinka.

Ključne riječi: kondenzirani tanini, hidrolizirajući tanini, pilići u tovu, proizvodni rezultati, probavni sustav

EXTENDED ABSTRACT

A COMPARISON OF THE EFFECT OF CONDENSED (QUEBRACHO) AND HYDROLYSABLE (SWEET CHESTNUT) TANNINS ON PRODUCTION RESULTS AND THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS

INTRODUCTION

The intensification of poultry production, driven by global population growth, urbanisation, and increasing demand for high-quality animal protein, has positioned poultry production as one of the most dynamic sectors of modern animal agriculture. High growth rates, favourable feed conversion efficiency, and relatively short production cycles make poultry meat a key component of global food security. However, the intensification of production systems is accompanied by substantial challenges related to animal health and welfare, product quality, environmental sustainability, and public health concerns. One of the most significant regulatory milestones affecting contemporary poultry production was the ban on the use of antibiotic growth promoters (AGPs) in the European Union in 2006. While this measure has delivered clear public health benefits, it has also created an urgent need for effective, safe, and sustainable nutritional strategies capable of maintaining gut health, production performance, and product quality in the absence of AGPs. In this context, increasing scientific attention has been directed toward natural bioactive compounds, particularly phytochemical feed additives, as potential alternatives to conventional antimicrobial agents. Among these, tannins, plant-derived polyphenolic compounds, have emerged as one of the most promising groups due to their antimicrobial, antioxidant, astringent, and immunomodulatory properties. Nevertheless, the biological effects of tannins are highly heterogeneous and strongly dependent on their chemical structure, molecular weight, solubility, and degree of polymerisation. This structural diversity has contributed to inconsistent findings in the literature and has complicated the standardisation and practical application of tannin-based products in poultry nutrition. Consequently, a clear distinction between hydrolysable tannins (HT) and condensed tannins (CT), as well as a critical evaluation of their differential biological effects, is essential for their rational and safe use in broiler production. The aim of this doctoral dissertation was to comparatively evaluate the effects of HT derived from chestnut and CT derived from quebracho on production performance, contact dermatitis, gastrointestinal health, antioxidant and immune status, and the quality of edible tissues in broiler chickens. The study aimed to provide a comparative evaluation of the effects

of two chemically distinct groups of tannins in broiler chickens and to assess their applicability as functional feed additives in antibiotic-free production systems.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the Ethics Committee for Veterinary Medicine (Class: 640-01/25-18; Reg. No. 251-61-01/139-25-18). The relevant institutional ethics committee approved all experimental procedures. The experimental trial was conducted on 150 Ross 308 broiler chickens, randomly allocated to three dietary treatments: a control group fed a standard commercial diet, a group fed a diet supplemented with 0.75 g/kg CT, and a group fed a diet supplemented with 0.75 g/kg HT. Birds were reared under standard commercial conditions on deep litter and had *ad libitum* access to feed and water throughout a 42-day production cycle. At the end of the experimental period, birds were slaughtered under commercial conditions, and samples of breast and thigh muscles, liver, and sections of the gastrointestinal tract (duodenum and caecum) were collected. Muscle and liver samples were immediately frozen and stored at -80°C , while intestinal samples were fixed for histological examination. Faecal samples were collected for microbiological analysis.

Growth performance parameters, including body weight, weight gain, feed intake, feed conversion ratio, and mortality, were monitored throughout the trial. Animal welfare indicators, including litter moisture content, ammonia concentration in the broilers' biozone, and the incidence of contact dermatitis of footpads and hock joints, as well as mortality, were recorded during the experiment. In addition to *in vivo* assessments, the antioxidant and antimicrobial properties of HT and CT were evaluated using established analytical methods. The antioxidant capacity of tannins was determined using DPPH radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. To evaluate lipid metabolism and oxidative stability, fatty acid composition of breast and thigh muscle tissue was determined by gas chromatography–mass spectrometry, while lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde concentrations using high-performance liquid chromatography. Immune-related and pro-inflammatory responses were investigated by analysing the hepatic expression of selected genes (TLR4, IL6, TNF α) using real-time PCR, alongside the quantification of secretory immunoglobulin A in the intestinal mucosa. Intestinal health was further evaluated through histomorphometry analysis of duodenal and caecal sections and by quantification of faecal *Escherichia coli*.

RESULTS

Body weight and weight gain were significantly higher in the HT group than in the control group during both growth phases ($P < 0.05$), whereas no differences were observed between the control and CT groups or between the HT and CT groups ($P > 0.05$). Feed conversion ratio did not differ among groups ($P > 0.05$). Litter moisture and ammonia concentration were significantly reduced in the HT and CT groups compared with the control group ($P < 0.05$), with lower ammonia levels in the CT group than in the HT ($P < 0.05$). The incidence of footpad dermatitis and hock burn dermatitis was significantly lower in the HT and CT groups than in the control group ($P < 0.05$), with lower footpad dermatitis incidence in the CT group through day 28 ($P < 0.05$). No mortality was recorded. In the DPPH test, the CT group showed a significantly lower IC_{50} value than BHT and HT ($P < 0.001$), whereas HT exhibited a higher IC_{50} value than BHT ($P < 0.001$). Both HT and CT showed lower reducing capacity than BHT in the FRAP assay ($P < 0.001$). Fatty acid composition was largely unaffected by treatment; however, linoleic acid (C18:2n6) was higher in the CT group, while docosahexaenoic acid (C22:6n3) and the C22:5n3/C22:6n3 ratio were higher in the HT group ($P < 0.05$). Malondialdehyde concentrations in tissues and serum were reduced in the HT and CT groups compared with the control group, with generally lower values in the CT group. Hepatic expression of TLR4, IL6, and TNF α was significantly downregulated in both HT and CT groups ($P < 0.05$). Fecal *Escherichia coli* counts were significantly lower in the HT and CT groups than in the control group ($P < 0.001$), with lower counts in HT than in CT. Jejunal villus morphology and ileal secretory IgA concentration were improved in both HT and CT groups compared with the control group ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The results demonstrated that HT, in contrast to CT, significantly improved production performance, whereas both tannin types exerted beneficial effects by reducing ammonia concentration, litter moisture, and the incidence of contact dermatitis. Tannins also exhibited pronounced antioxidant activity, reflected by a reduced malondialdehyde (MDA) concentration in serum and tissues, with clear differences observed in the underlying mechanisms of action between HT and CT. Furthermore, dietary tannin supplementation positively modulated the intestinal microbiota, including a reduction in *Escherichia coli* counts, and improved intestinal morphometry through increased villus height and surface area. A strong anti-inflammatory and immunomodulatory effect was also observed, evidenced by decreased expression of pro-inflammatory cytokines and increased levels of secretory IgA in the intestinal mucosa.

Collectively, these findings confirm that tannins represent functional feed additives with considerable potential to enhance health status, welfare, and production efficiency in broiler chickens, provided that their type, botanical source, and dietary inclusion level are carefully selected.

CONCLUSION

Based on the results, it can be concluded that HT improved production performance, whereas such an effect was not observed with CT. Both tannin types reduced the incidence of contact dermatitis and ammonia levels in the animals' microenvironment, thereby improving animal welfare and respiratory health. Tannin supplementation also enhanced antioxidant defense, exhibited anti-inflammatory and immunomodulatory effects, and reduced *E. coli* counts in feces. In addition, both tannin types positively influenced intestinal morphometry, indicating preservation of intestinal barrier integrity and increased absorptive surface area. The observed differences in the magnitude and nature of effects between HT and CT confirm the existence of distinct mechanisms of action, highlighting the need for further research aimed at optimizing their use and exploring potential synergistic effects in broiler nutrition.

Key words: condensed tannins, hydrolysable tannins, broiler chickens, production performance, gastrointestinal tract

POPIS PRILOGA

SLIKE

slika 1. Podjela tanina

slika 2. Strukturna formula taninske kiseline

slika 3. Pokusne skupine i tretmani

slika 4. Cekum i duodenom u probavnom sustavu pilića

slika 5. Vaganje pilića

slika 6. Sušenje stelje u termostatu

slika 7. Skala za procjenu pojavnosti kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu pilića u tovu

slika 8. Skala za procjenu pojavnosti kontaktnog dermatitisa na tarzalnim zglobovima pilića u tovu

slika 9. Kromatogram standarda 37 Component FAME mix (Supelco, Bellfonte, PA, USA) korišten za identifikaciju masnih kiselina

Slika 10. Reprezentativni kromatogrami tkiva *m. iliotibialis cranialis* i *m. pectoralis superficialis*

slika 11. A) Preklapljeni kromatogrami standarda malondialdehida korišteni za generiranje kalibracijske krivulje i B) Reprezentativni kromatogram koncentracije malondialdehida (TBARS) u tkivu jetre

slika 12. Tjelesna masa tovnih pilića 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 13. Tjelesni prirast tovnih pilića (g/dan) u razdoblju od 1. do 21. dana te od 21. do 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) i pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 14. Konverzija hrane (g hrane/g prirasta) u razdoblju od 1. do 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 15. Vrijednosti DPPH (A) i FRAP (B) u razdoblju od 1. do 42. dana istraživanja u pokusnim skupinama HT i KT u odnosu na BHT standard (arit. sred. \pm SD)

slika 16. Koncentracija malondialdehida (MDA; nmol/g tkiva) u mišiću *m. pectoralis superficialis* (A) i u mišiću *m. iliotibialis cranialis* (B) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 17. Koncentracija malondialdehida (MDA) u jetri (nmol/g tkiva) (A) i serumu (nmol/ml plazme) (B) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 18. Ekspresija gena TLR4 (A), IL6 (B) i TNF α (C) u jetri u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 19. Broj *Escherichia coli* u izmetu (CFU/g) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 20. Duljina (A) i površina (B) resica jejunuma u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

slika 21. Koncentracija ELISA sekretornog IgA sluznice ileuma (sIgA; ng/mg proteina) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

TABLICE

tablica 1. Kemijski sastav osnovne krmne smjese

tablica 2. Uvjeti tijekom analize plinske kromatografije s masenom detekcijom MS

tablica 3. Uvjeti tijekom mjerenja na kromatografu

tablica 4. Početnice ispitivanih gena od interesa

tablica 5. Uvjeti RT-qPCR reakcija

tablica 6. Koncentracija amonijaka (ppm) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

tablica 7. Učestalost kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu i tarzalnim globovima u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

tablica 8. Sastav masnih kiselina u mišiću m. iliotalialis cranialis u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

POPIS KRATICA

AH – donor elektrona

ANOVA- analiza varijance

APEC – avian pathogenic Escherichia coli

APR – antibiotski promotor rasta

BHT – butilirani hidroksitoluen (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol)

CAT – katalaza

CFU – jedinice koje tvore kolonije (eng. *Colony Forming Units*)

CYP3A – citokrom P450 3A

DHA – dokozaheksaenske kiseline

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

ELISA – enzimski povezani imunosorbentni test

EPA – eikozapentaenska kiselina

FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GSH-Px – Glutation-perioksidaza (eng. *Glutathione Peroxidase*)

H&E – hematoksilin i eozin

H₂S – vodikov sulfid

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

HT – hidrolizirajući tanini

IC₅₀ - koncentracija antioksidansa potrebna za 50 % inhibicije DPPH radikala

IgA – imunoglobulin A

IL-10 – interleukin 10

IL-1β – interleukin-1 beta

IL-6 – interleukin 6

KT – kondenzirani tanini

MDA – Malonaldehid

mRNA – mitohondrijska ribonukleinska kiselina

n3 – omega 3 masne kiseline

n6 – omega 6 masne kiseline

NH₃ – amonijak

NMK – niže masne kiseline

PUFA – dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivni kisikovi spojevi

RT-qPCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

SCFA – niže masne kiseline (eng. *Short-Chain Fatty Acids*)

SD – standardna derivacija

sIgA – sekretorni Imunoglobulin A

SOD – superoksid-dismutaza (eng. Superoxide Disumatase)

T-AOC – ukupni antioksidativni kapacitet (eng. Total Antioxidant Capacity)

TBA – tiobarbituratna kiselina

TBARS – tiobarbituratna kiselina i reaktivne supstance

TEP – 1,1,3,3-tetraethoxypropane

TLR4 – Toll-like receptor 4

TNF- α – faktora tumorske nekroze α

TPTZ – 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA.....	3
2.1. Tanini – definicija, kemijska priroda i klasifikacija.....	3
2.1.1. Hidrolizirajući tanini.....	4
2.1.2. Taninska kiselina.....	4
2.1.3. Kondenzirani tanini.....	6
2.1.4. Složeni tanini.....	6
2.2. Tanini kao bioaktivni spojevi u hranidbi farmskih životinja.....	7
2.3. Uporaba tanina u hranidbi različitih vrsta domaćih životinja.....	8
2.3.1. Sinergistički učinak tanina.....	10
2.4. Tanini u prehrani peradi.....	11
2.4.1. Antimikrobno i antiparazitno djelovanje tanina.....	11
2.4.2. Utjecaj tanina na crijevnu mikrobiotu.....	12
2.4.3. Antioksidativno djelovanje tanina.....	12
2.4.4. Utjecaj tanina na morfologiju i funkciju crijeva.....	13
2.4.5. Imunomodulatorno djelovanje tanina.....	14
2.4.6. Utjecaj tanina na proizvodne rezultate i kvalitetu mesa.....	15
2.4.7. Utjecaj tanina na mikroklimatske čimbenike i dobrobit.....	16
2.4.8. Sinergistički učinci tanina u prehrani peradi.....	17
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	18
3.1. Ciljevi.....	18
3.2. Hipoteza.....	18
4. MATERIJAL I METODE.....	19
4.1. Pokusne životinje.....	19
4.2. Plan istraživanja.....	19
4.3. Uzimanje uzoraka.....	21
4.4. Proizvodni rezultati.....	22
4.5. Vlaga stelje.....	23
4.6. Koncentracija amonijaka.....	24
4.7. Pojavnost kontaktnih dermatitisa.....	24
4.8. Mortalitet.....	25
4.9. Antioksidativna svojstva HT-a i KT-a.....	26

4.9.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	26
4.9.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	26
4.10. Analiza sastava masnih kiselina.....	27
4.11. Analiza koncentracije MDA u mišićnom i jetrenom tkivu.....	30
4.12. Analiza ekspresije gena imunološkog odgovora i proupalnih gena.....	33
4.13. Kvantifikacija fekalne <i>Escherichije coli</i>	35
4.14. Morfometrija crijeva.....	35
4.15. Određivanje sekretornog IgA u sluznici crijeva metodom ELISA.....	36
4.16. Statistička obrada podataka.....	36
5. REZULTATI.....	37
5.1. Proizvodni rezultati.....	37
5.2. Vlaga stelje.....	40
5.3. Koncentracija amonijaka.....	40
5.4. Pojavnost kontaktnih dermatitisa.....	41
5.5. Mortalitet.....	41
5.6. Antioksidativna svojstva HT-a i KT-a.....	42
5.7. Sastav masnih kiselina.....	42
5.8. Koncentracije MDA.....	44
5.9. Ekspresija proinflamatornih gena u tkivu jetre.....	46
5.10. Kvantifikacija fekalne <i>E. coli</i>	47
5.11. Morfometrija crijeva.....	48
5.12. ELISA sekretorni IgA sluznice crijeva.....	49
6. RASPRAVA.....	50
7. ZAKLJUČCI.....	60
8. POPIS LITERATURE.....	61
9. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA.....	80

1. UVOD

Sve izraženija industrijalizacija poljoprivrede, globalni demografski rast, urbanizacija te porast kupovne moći stanovništva doveli su do značajnog povećanja potražnje za visokovrijednim proteinima životinjskog podrijetla u ljudskoj prehrani. U takvim okolnostima peradarska proizvodnja bilježi osobito snažan razvoj, ponajprije zbog visokog proizvodnog prinosa, povoljne učinkovitosti konverzije hrane i relativno kratkog proizvodnog ciklusa, što je svrstava među najdinamičnije sektore stočarske proizvodnje. Procjene upućuju na daljnji rast potražnje za pilećim mesom, uz predviđanje da bi peradarska proizvodnja do 2031. godine mogla dosegnuti oko 377 milijuna tona, čime se naglašava njegova važna uloga u globalnom sustavu proizvodnje hrane (NECHITALIO i sur., 2024.).

Međutim, intenziviranje peradarske proizvodnje povezano je s nizom izazova koji se odnose na očuvanje zdravlja i dobrobiti životinja, kao i na dugoročnu održivost proizvodnih sustava (CHOI i KIM, 2020.). Suvremeno peradarstvo stoga je usmjereno na razvoj nutritivnih i tehnoloških pristupa koji omogućuju očuvanje funkcionalnosti probavnog sustava, unaprjeđenje proizvodnih pokazatelja te smanjenje negativnog utjecaja proizvodnje na okoliš.

Zabrana uporabe antibiotičkih promotora rasta (APR) u Europskoj uniji 2006. godine predstavlja jednu od ključnih prekretnica u suvremenoj stočarskoj proizvodnji. Ova je regulatorna mjera donijela značajne javnozdravstvene koristi te je istodobno otvorila prostor za primjenu učinkovitih, sigurnih i održivih alternativa usmjerenih na očuvanje zdravstvenog statusa peradi i proizvodne učinkovitosti. Dodatno, sve izraženiji zahtjevi potrošača za zdravstveno ispravnom, ekološki prihvatljivom i na etički način proizvedenom hranom životinjskog podrijetla usmjeravaju tržište prema proizvodnim sustavima koji smanjuju uporabu antimikrobnih lijekova, ograničavaju emisije štetnih tvari te osiguravaju višu razinu dobrobiti životinja (LI i SHAN, 2025.). Takvi tržišni i regulatorni okviri dodatno potiču razvoj održivih, znanstveno utemeljenih i praktično primjenjivih nutritivnih strategija u suvremenoj peradarskoj proizvodnji.

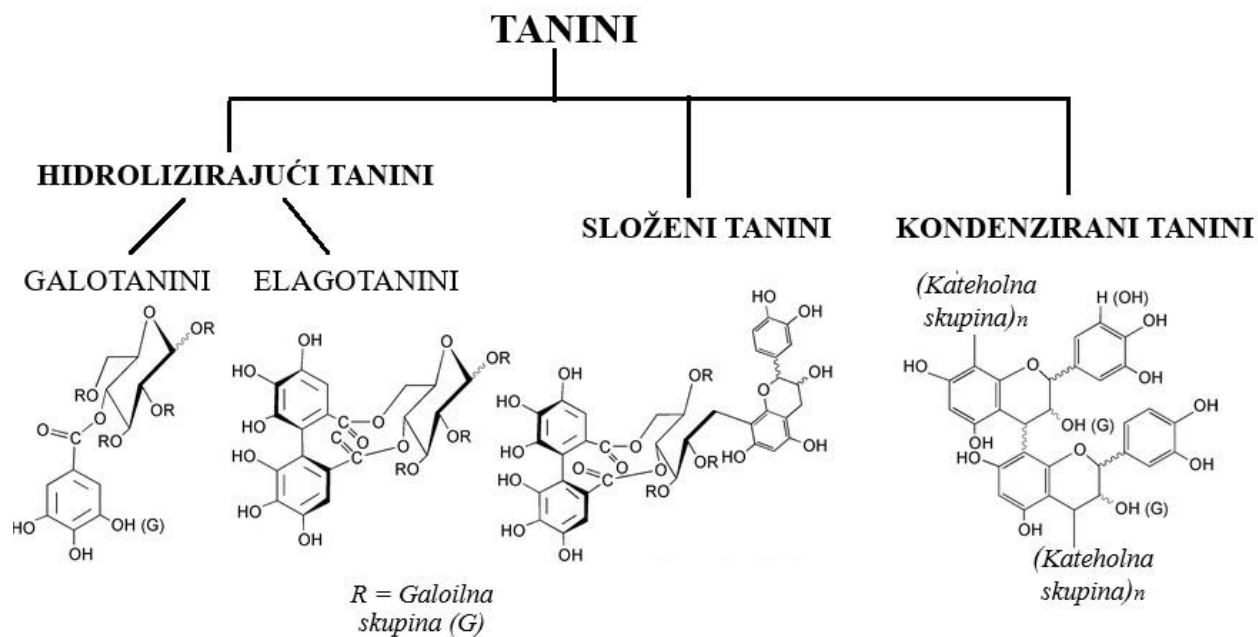
Posljedično tome, posljednjih je godina zabilježen porast znanstvenih istraživanja vezanih uz prirodne bioaktivne spojeve, osobito fitogene aditive, kao potencijalne zamjene za konvencionalne antimikrobne pripravke (antibiotike) (MEHDI i sur., 2018.). U tom istraživačkom okviru osobito se ističu biljni polifenoli, među kojima su tanini, prepoznati kao jedna od najperspektivnijih skupina spojeva, ponajprije zbog svojeg antimikrobnog, antioksidativnog i imunomodulatornog djelovanja (MAŠEK i sur., 2014.; HUANG i sur., 2018.; CHOI i KIM, 2020.).

Unatoč rastućem znanstvenom interesu za primjenu tanina u hranidbi peradi, njihovi učinci još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Djelovanje tanina izrazito je heterogeno te ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, molekulskoj masi, topivosti i stupnju polimerizacije, što značajno otežava standardizaciju pripravaka i usporedivost rezultata različitih istraživanja (MAŠEK i sur., 2014.). Stoga, ako se tanini razmatraju kao potencijalno multifunkcionalni nutritivni aditivi, njihova optimalna i sigurna primjena u tovu pilića zahtijeva jasno razlikovanje hidrolizirajućih (HT) i kondenziranih (KT) tanina te kritičku evaluaciju njihovih učinaka na proizvodne pokazatelje i funkcionalnost probavnog sustava.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Tanini – definicija, kemijska priroda i klasifikacija

Tanini su heterogena skupina biljnih polifenola. Oni predstavljaju sekundarne metabolite u biljaka koji im prvenstveno služe u svrhu kemijske obrane od biljojeda, mikroorganizama i oksidativnog stresa (HASSANPOUR i sur., 2011.). Njihova najznačajnija odlika je sposobnost taloženja proteina, koja proizlazi iz višestrukih fenolnih skupina i mogućnosti uspostave jakih vodikovih i hidrofobnih interakcija s proteinima i metalnim ionima (HASLAM, 1996.; HASLAM, 1998.). Na temelju strukturnih obilježja tanini se dijele na HT, KT i složene tanine (KHANBABAEE i VAN REE, 2001.) (slika 1.).



slika 1. Podjela tanina (pripremljeno prema KHANBABAEE i VAN REE, 2001.)

2.1.1. Hidrolizirajući tanini

Hidrolizirajući tanini strukturno su definirani kao esteri fenolnih kiselina – ponajprije galne i elaginske kiseline – s ugljikohidratnom jezgrom, najčešće D-glukozom (OKUDA i ITO, 2011.). Pod djelovanjem kiselina, baza ili enzima tanin acil hidrolaza oni se hidroliziraju na galnu i elaginsku kiselinu te šećernu jezgru, a upravo su galna i elaginska kiselina prepoznate kao glavni nositelji biološkog učinka HT-a u probavnom sustavu monogastričnih životinja.

Prema strukturi, HT se dijele na galotanine, u kojima su galoilne skupine direktno esterificirane na glukozu, te elagitanine, kod kojih su dvije ili više galoilnih jedinica međusobno povezane u heksahidroksidifenil strukturu koja se spontano ili enzimatski pretvara u elaginsku kiselinu (OKUDA i ITO, 2011). Molekulska masa HT-a obično se kreće između 500 i 3.000 Da (KHANBABAEE i VAN REE, 2001.), što im daje relativno visoku topljivost u vodi i mogućnost brze interakcije s proteinima, enzimima i mikroorganizmima u lumenu probavnog sustava.

Galotanini se nalaze u mnogim biljkama, uključujući kineske žučice (*Rhus semialata*) i turske žučice (*Gallae turcicae*), vrste roda *Paeonia* i *Schinus terebinthifolius*, lišće sicilijanskog suma (*Rhus coriaria* L.) te običnog ruja (*Cotinus coggygria* Scop.). Prisutni su i u mahunarkama, osobito u crvenom mačjem grahu (*Canavalia gladiata*), kao i u ljusci sjemenki stabla kamelije (*Camellia oleifera* C. Abel). Njihova je prisutnost utvrđena i u kori, koštici i lišću manga (HE, 2022.). Elagitanini su široko rasprostranjeni u biljkama te se nalaze u brojnim vrstama, uključujući *Agrimonia pilosa*, kameliju (*Camellia japonica*), dren (*Cornus officinalis*), iglicu (*Geranium thunbergii*) geraniin, zdravac (*Geum japonicum*), likvidambar (*Liquidambar formosana*) te *Mallotus japonicus*. Također, elagitanini su prisutni i u voću iz porodice *Rosaceae*, uključujući maline, kupine, jagode, ribiz i grožđe, kao i u plodovima poput nara i rambutana te u sjemenkama pistacija, oraha, indijskih oraščića, pekan oraha i žirova (RAYA-MORQUECHO i sur., 2025.).

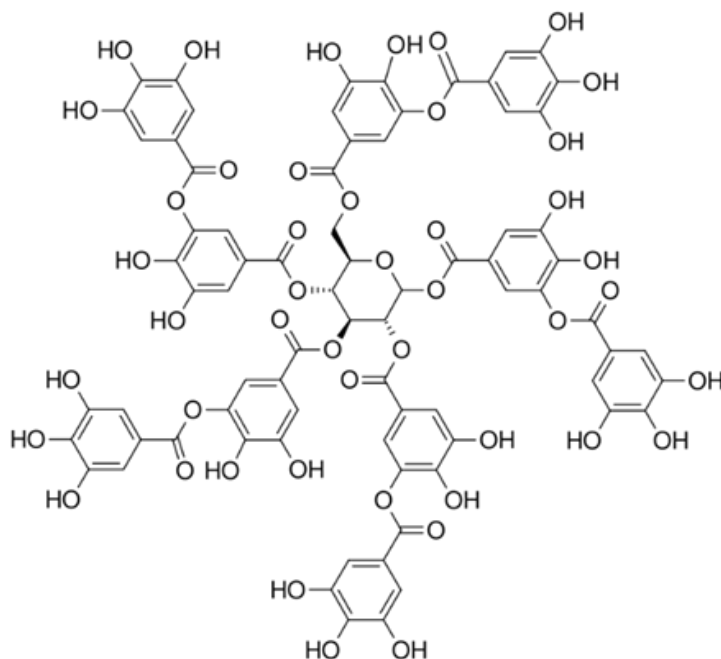
2.1.2. Taninska kiselina

Taninska kiselina predstavlja specifičan oblik biljnog polifenola visoke molekulske mase, a kemijski je definirana kao mješavina estera glukoze s galnom kiselinom, odnosno galotanina. Građena je od poligaloil-glukoze te poligaloil-estera kininske kiseline, pri čemu pojedina molekula može sadržavati između 2 i 12 galoilnih skupina, ovisno o biljnom izvoru i stupnju esterifikacije (HASLAM, 1996.; KHANBABAEE i VAN REE, 2001.). Varijabilnost u broju i rasporedu galoilnih skupina rezultira značajnim razlikama u fizikalno-kemijskim svojstvima taninske

kiseline, uključujući njezinu topljivost, reaktivnost i biološku aktivnost. Strukturna formula taninske kiseline prikazana je na slici 2. Ova svojstva uvjetuju njezine biološke učinke u probavnom sustavu životinja u kojem može djelovati i nutritivno i antinutritivno, što ovisi o primijenjenoj koncentraciji i fiziološkom stanju životinje.

Važno je naglasiti da taninska kiselina nije sinonim za HT niti za KT, iako se često pogrešno poistovjećuje s cjelokupnom skupinom tanina. Hidrolizirajući tanini obuhvaćaju širi spektar spojeva, uključujući galotanine i elagitanine, dok su KT (proantocijanidini) strukturno različiti i građeni od flavan-3-ol jedinica (KHANBABAEE i VAN REE, 2001.; MUELLER-HARVEY, 2006.). Navedene strukturne razlike rezultiraju bitno različitim svojstvima stabilnosti, metabolizma i biološkog djelovanja pojedinih skupina tanina.

Unatoč jasno definiranim kemijskim i funkcionalnim razlikama, u znanstvenoj literaturi pojam taninske kiseline nerijetko se koristi kao opći naziv za tanine, bez preciznog razgraničenja između pojedinih kemijskih oblika. Takav pristup može dovesti do pogrešnih interpretacija eksperimentalnih rezultata i netočnih zaključaka. Stoga je u znanstvenim istraživanjima nužno jasno specificirati kemijski oblik tanina, njegov biljni izvor, čistoću te primijenjenu dozu.



slika 2. Strukturna formula taninske kiseline

2.1.3. Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini spadaju u najzastupljenije skupine prirodnih fenolnih polimera te su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Nazivaju se i proantocijanidini, a prema strukturi govorimo o oligomerima i polimerima koji su građeni od jedinica flavan-3-ola, kao što su katehin i epikatehin, međusobno povezanih C–C vezama. Za razliku od HT-a, KT ne podliježu jednostavnoj kiselinskoj ili enzimskoj hidrolizi na fenolne kiseline, a njihova molekulska masa može dosegnuti više od 20.000 Da, što ih čini slabije topljivima i kemijski stabilnijima (KHANBABAEE i VAN REE, 2001.).

Najviše koncentracije nalaze se u kori i srži brojnih vrsta drveća, osobito mimoze (*Acacia mearnsii*), quebracha (*Schinopsis spp.*) i hrasta (*Quercus spp.*), a osim u drveću, obilno su prisutni i u orašastim plodovima, voću, sjemenkama, listovima, grančicama i stabljikama određenih leguminoznih biljaka (PANZELLA i NAPOLITANO, 2017.; BODOIRA i sur., 2020.; FRAGA-CORRAL i sur., 2020.; MOCCIA i sur., 2020.). Novija istraživanja KT-a u peradarskoj proizvodnji sve su češće usmjerena na ekstrakte iz mimoze i quebracha.

2.1.4. Složeni tanini

Složeni tanini predstavljaju posebnu skupinu polifenolnih spojeva koji se strukturno ubrajaju među najkompleksnije oblike tanina, a nastaju kovalentnim povezivanjem kondenziranih i hidrolizirajućih tanina. Točnije, riječ je o spojevima u kojima je flavan-3-olna (katehinska) jedinica povezana s galotaninskom ili elagitaninskom komponentom, pri čemu molekula istodobno sadrži obilježja obje skupine. Takva hibridna struktura uključuje prisutnost C–C ili C–O veza karakterističnih za kondenzirane tanine, kao i esterskih veza tipičnih za hidrolizirajuće tanine, što rezultira visokom strukturnom raznolikošću i kemijskom kompleksnošću (KHANBABAEE i VAN REE, 2001.).

Zbog svoje složene građe, ovi spojevi pokazuju specifična fizikalno-kemijska svojstva koja se razlikuju od svojstava pojedinačnih skupina tanina, uključujući umjerenu topljivost, povećanu stabilnost te izraženu sposobnost interakcije s proteinima i drugim biomolekulama (MUELLER-HARVEY, 2006.; KHANBABAEE i VAN REE, 2001.). Biološka aktivnost složenih tanina obuhvaća antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva, pri čemu se njihovi učinci često pripisuju sinergijskom djelovanju kondenziranih i hidrolizirajućih komponenti (PANZELLA i NAPOLITANO, 2017.; FRAGA-CORRAL i sur., 2020.).

Složeni tanini manje su zastupljeni u usporedbi s hidrolizirajućim i kondenziranim taninima, ali su identificirani u različitim biljnim vrstama. Njihova prisutnost povezana je s obrambenim mehanizmima biljaka, dok u prehrambenom i farmakološkom kontekstu mogu značajno doprinijeti funkcionalnim svojstvima biljnih ekstrakata i sirovina (HASLAM, 1996.).

2.2. Tanini kao bioaktivni spojevi u hranidbi farmskih životinja

U ranijim istraživanjima tanini su uglavnom klasificirani kao antinutritivni čimbenici, ponajprije zbog njihova negativnog utjecaja na iskoristivost proteina i energije u obroku, što je uvelike ograničavalo njihovu primjenu u hranidbi životinja (MUELLER-HARVEY, 2006.). Međutim, daljnja istraživanja jasno su pokazala da je djelovanje tanina ovisno o dozi, pri čemu se pri niskim i umjerenim koncentracijama mogu ostvariti povoljni fiziološki učinci, dok se negativni učinci javljaju uglavnom pri višim dozama (MAŠEK i sur., 2014.; EBRAHIM i sur., 2015.).

Sukladno tome, u sadašnjim istraživanjima tanini se sve češće razmatraju kao funkcionalni dodaci hranidbi životinja te kao potencijalna prirodna alternativa APR-ovima. Ovaj pomak temelji se na prepoznavanju njihovih višestrukih bioloških svojstava, uključujući antimikrobno, antioksidativno, adstringentno i imunomodulacijsko djelovanje, kao i na sposobnost modulacije crijevne mikrobiote (MAŠEK i sur., 2014.; HUANG i sur., 2018.; CHOI i KIM, 2020.).

U probavnom sustavu životinja tanini djeluju putem više međusobno povezanih i komplementarnih mehanizama, čiji intenzitet i smjer ovise o njihovoj kemijskoj strukturi, dozi i mjestu djelovanja. Jedan od temeljnih mehanizama njihova djelovanja jest interakcija s proteinima, uključujući prehrambene proteine, probavne enzime i proteine staničnih membrana. Ova interakcija može dovesti do smanjene probavljivosti određenih hranjivih tvari, ali istodobno može imati i zaštitnu ulogu, primjerice sprječavanjem prerane razgradnje proteina u probavnom traktu (MAKKAR i sur., 2003.).

Antimikrobno djelovanje tanina temelji se na inhibiciji izvanstaničnih mikrobnih enzima, uskraćivanju supstrata nužnih za mikrobnii rast te izravnim djelovanjem na mikrobnii metabolizam putem inhibicije oksidativne fosforilacije, uz dodatni mehanizam vezanja željeza (SCALBERT, 1991.). Ipak, unatoč navedenim mehanizmima, brojna istraživanja ističu potrebu daljnjeg razjašnjavanja točnih procesa koji dovode do smanjene proliferacije patogenih mikroorganizama (TOSI i sur., 2013.). Složenost djelovanja tanina dodatno je naglašena činjenicom da pojedini mikroorganizmi mogu razviti mehanizme otpornosti, uključujući detoksifikaciju tanina sintezom

polimera, oksidacijom, biološkom razgradnjom ili sintezom siderofora (SCALBERT, 1991.; SMITH i sur., 2004.).

Osim izravnog antimikrobnog učinka, tanini mogu modulirati sastav i metaboličku aktivnost crijevne mikrobiote, pri čemu se bilježi selektivna stimulacija bakterija povezanih s fermentacijom i proizvodnjom nižih masnih kiselina (SCFA), što upućuje na njihov potencijalni prebiotički učinak (MOLINO i sur., 2022.). Nadalje, tanini mogu pridonijeti očuvanju integriteta crijevne barijere, smanjujući intestinalnu permeabilnost i podupirući funkciju epitelnih spojeva, čime dodatno doprinose zdravlju gastrointestinalnog trakta (YU i sur., 2020.).

Kao polifenolni spojevi, tanini se smatraju snažnim antioksidansima koji su sposobni neutralizirati reaktivne kisikove spojeve (ROS) te modulirati aktivnost endogenih antioksidativnih enzima, uključujući superoksid-dismutazu, katalazu i glutation-peroksidazu, čime pridonose zaštiti lipida, proteina i DNK od oksidativnog stresa (HAGERMAN i sur., 1998.; MUELLER-HARVEY, 2006.; SHAHIDI i AMBIGAIPALAN, 2015.; SURAI, 2016.).

Uz navedeno, tanini pokazuju i imunomodulacijski učinak, pri čemu suplementacija taninima može smanjiti razinu proupalnih citokina te povećati ekspresiju antiupalnih medijatora, kao i razinu imunoglobulina, uključujući sekretorni IgA, što upućuje na jačanje mukoznog imuniteta i održavanje imunološke homeostaze u gastrointestinalnom traktu (LIU i sur., 2023.). Dodatno, zabilježeno je i antiparazitno djelovanje tanina, osobito u kontekstu smanjenja intenziteta infekcija gastrointestinalnim nematodama, čime se dodatno naglašava njihov potencijal u održivoj hranidbi životinja (HOSTE i sur., 2022.).

2.3. Uporaba tanina u hranidbi različitih vrsta životinja

Velik broj istraživanja bavi se primjenom tanina u hranidbi različitih vrsta životinja, pri čemu su dobiveni rezultati često neujednačeni, što se u velikoj mjeri može pripisati razlikama između HT-a i KT-a, kao i varijacijama u dozi, izvoru tanina, sastavu obroka i vrsti životinje.

Primjena HT-a u hranidbi preživača i monogastričnih životinja povezana je ponajprije s učincima na metabolizam proteina i dušika te funkciju probavnog epitela. U tovne junadi dodatak HT-a u obrok na bazi proteinski bogate silaže lucerne nije utjecao na proizvodnju metana, ali je smanjio probavljivost sirovih proteina te preusmjerio izlučivanje dušika iz urina u feces (ABOAGYE i sur., 2019.). Kod mliječnih krava zabilježeni su povoljniji učinci, uključujući povećanje proizvodnje mlijeka te smanjenje koncentracije uree i broja somatskih stanica u mlijeku

(ALI i sur., 2017.). Nadalje, dodatak HT-a u mlijeku za telad poboljšao je rast, antioksidacijski status i opće zdravstveno stanje teladi, uz smanjenu prisutnost patogena u fecesu (SERRI i sur., 2022.). U monogastričnih životinja HT su pokazali izraženije učinke na crijevnu funkciju i metabolizam nego na proizvodne pokazatelje. U prasadi je dodatak HT-a poboljšao učinkovitost iskorištenja hrane i smanjio proteolitičku aktivnost crijevne mikrobiote (BIAGI i sur., 2010.), dok su kod prasadi nakon odbića zabilježeni pozitivni učinci na učestalost i trajanje proljeva, bez utjecaja na unos hrane i prosječan dnevni prirast (GIRARD i sur., 2018.). Mehanistička istraživanja dodatno potvrđuju da HT mogu modulirati unos glukoze i prolaz galne kiseline kroz epitel tankog crijeva svinje (BRUS i sur., 2021.), kao i regulirati ekspresiju enzima CYP3A u sluznici debelog crijeva tovnih nerasta (ZAMARATSKAIA i sur., 2016.).

Za razliku od HT-a, KT u hranidbi životinja pokazuju stabilnije, ali često blaže i dugotrajnije učinke, osobito povezane s iskorištavanjem dušika, kvalitetom proizvoda i antioksidacijskim statusom, dok su učinci na proizvodne rezultate često ograničeni ili ovisni o dozi. U mliječnim krava dodatak KT-a doveo je do smanjenja koncentracije uree u mlijeku, bez značajnog utjecaja na ukupnu ili energetske korigiranu mliječnost (GERLACH i sur., 2018; ZHANG i sur., 2019.). Slični nalazi potvrđuju da KT ne utječu značajno na unos hranjivih tvari, sintezu mikrobnih proteina ni metaboličke pokazatelje u plazmi. U janjadi dodatak KT-a nije utjecao na prirast, unos i konverziju hrane niti na osnovne parametre kvalitete mesa, ali je poboljšao randman trupa, povećao udio intramuskularne masti i nezasićenih masnih kiselina, potaknuo antioksidacijski status te smanjio koncentraciju kolesterola i intenzitet lipidne peroksidacije (BRUNETTO i sur., 2024.). Kod mlijećnih koza zabilježen je izražen učinak ovisan o dozi, pri čemu je najveći mliječni prinos postignut s dodatkom 4 % KT-a, dok je viša razina (6 %) imala negativan učinak (BATTELI i sur., 2024.). U svinja su KT pokazali ograničen utjecaj na proizvodne pokazatelje, ali su modulirali masnokiselinski sastav (SEONI i sur., 2021.), dok su u odojaka u fazi prestajanja sisanja pozitivno utjecali na prirast i sastav crijevne mikrobiote (DE SOUZA i sur., 2025.). Suprotno tome, u amura je primjena KT-a bila povezana sa smanjenjem rasta i narušenom imunološkom funkcijom crijeva, što ukazuje na osjetljivost određenih vrsta na ovu skupinu spojeva (LI i sur., 2000.).

2.3.1. Sinergistički učinak tanina u hranidbi različitih vrsta životinja

Dosadašnja istraživanja upućuju na to da dodatak mješavina HT-a i KT-a u obroke različitih vrsta životinja može rezultirati sinergističkim učincima, pri čemu se biološko djelovanje ne može pripisati isključivo pojedinoj skupini tanina. U skladu s tim, na tržištu je danas dostupan velik broj komercijalnih pripravaka koji kombiniraju HT i KT, najčešće biljnog podrijetla iz kestena (*Castanea sativa*) i quebracha (*Schinopsis spp.*), s ciljem optimizacije njihovih funkcionalnih učinaka u hranidbi životinja.

U zebrice (*Danio rerio*) primjena komercijalne mješavine tanina Silvafeed® dovodi do djelomične obnove crijevne morfologije te smanjenja ekspresije proupalnih citokina, pri čemu je intenzitet učinka jasno ovisan o primijenjenoj dozi (IMPERATORE i sur., 2023.).

U mliječnih je krava dodatak mješavine tanina u obrok povezan s poboljšanom učinkovitošću umjetnog osjemenjivanja, promjenama u sadržaju mliječnih proteina te smanjenim izlučivanjem dušika urinom, dok su pri višim razinama zabilježeni i nepovoljni učinci, uključujući smanjen unos suhe tvari, nižu probavljivost hranjivih tvari i smanjenu koncentraciju proteina u mlijeku, što upućuje na izraženu ovisnost učinaka o dozi (CASTILLO i sur., 2025.). Suprotno tome, ABOAGYE i sur. (2019.) nisu utvrdili značajan utjecaj tanina na proizvodne pokazatelje, fermentacijske parametre buraga ni sastav hlapivih masnih kiselina, no zabilježeno je dosljedno smanjenje koncentracije amonijaka u buragu, neovisno o vrsti i dozi tanina, čime se potvrđuje njihov potencijal u modulaciji metabolizma dušika.

2.4. Tanini u prehrani peradi

Kod pilića crijevna mikrobiota ima ključnu ulogu u probavi i iskoristivosti hranjivih tvari, metaboličkim procesima, razvoju i regulaciji imunskog sustava te u zaštiti domaćina od kolonizacije patogenim mikroorganizmima (OAKLEY i sur., 2014; STANLEY i sur., 2014.). U uvjetima intenzivne peradarske proizvodnje, u kojima su životinje izložene visokoj gustoći naseljenosti i toplinskom stresu, održavanje stabilne i funkcionalne crijevne mikrobiote postaje jedan od ključnih ciljeva suvremenih hranidbenih strategija, osobito u sustavima bez primjene antibiotika kao promotora rasta.

2.4.1. Antimikrobno i antiparazitno djelovanje tanina

Kod tovnih pilića zabilježeni su različiti antimikrobni učinci tanina, koji uvelike ovise o njihovoj kemijskoj strukturi. Hidrolizirajući tanini u obroku tovnih pilića dovode do smanjenja pH vrijednosti u ileumu i žljezdanom želucu, što stvara nepovoljne uvjete za rast patogenih mikroorganizama te do smanjenja broja *Escherichia coli* u ileumu (DANESHMAND KHORASGANI i sur., 2025.), kao i u fecesu (STARČEVIĆ i sur., 2025.). Nadalje, TOSI i sur. (2013.) utvrdili su da HT učinkovito ograničavaju proliferaciju *Clostridium perfringens* i smanjuju težinu crijevnih oštećenja povezanih s nekrotičnim enteritisom, što potvrđuje njihov značajan antimikrobni potencijal u peradarskoj proizvodnji.

Također, značajna antimikrobna svojstva ima i taninska kiselina. Utjecaj na mikrobnu populaciju crijeva vidljiv je u povišenju razine nižih masnih kiselina i promjeni pH slijepog crijeva (MAŠEK et al., 2014.).

Zabilježeno je da KT smanjuju broj *Eimeria* oocista u fecesu te poboljšavaju preživljavanje jarebica, što upućuje na njihov doprinos kontroli protozoarnih infekcija (EŞKI i GÜLŞEN, 2025.). U kokoši nesilica KT iz quebracha značajno su smanjili izlučivanje jajašaca nematoda (*Ascaridia spp.* i *Heterakis spp.*) te oocista *Eimeria spp.*, dodatno potvrđujući njihovo antimikrobno i antiparazitno djelovanje u probavnom sustavu peradi (MARZONI i sur., 2020.). Osim toga, istraživanje na tovnim pilićima pokazalo je da KT mogu ublažiti negativne učinke infekcije bakterijom *Salmonella Heidelberg*, uz poboljšanje crijevne morfologije te porast tjelesne mase, što upućuje na njihovu ulogu u kontroli patogenih bakterija u stresnim uvjetima uzgoja (MAYSONNAVE i sur., 2024.). TANG i sur. (2021.) dodatno navode da KT tanini pri nižim

dozama (100 mg/kg) ostvaruju izraženiji antimikrobni i zaštitni učinak u odnosu na više doze, naglašavajući važnost optimalnog doziranja.

2.4.2. Utjecaj tanina na crijevnu mikrobiotu

Tanini ne djeluju isključivo „antibiotski“, već pokazuju selektivno modulacijsko djelovanje na crijevnu mikrobiotu, pri čemu mogu ograničiti rast patogenih i oportunističkih bakterija, dok istodobno povoljno utječu na bakterijske skupine uključene u fermentacijske procese i održavanje crijevne homeostaze (DÍAZ CARRASCO i sur., 2018.; MOLINO i sur., 2022.). Ovakav selektivni učinak razlikuje tanine od klasičnih antibiotika te upućuje na njihovu ulogu u stabilizaciji crijevnog mikrobiološkog ekosustava, a ne u njegovoj neselektivnoj supresiji.

2.4.3. Antioksidativno djelovanje tanina

Zbog visoke gustoće fenolnih skupina, tanini pokazuju izražena antioksidativna svojstva. Njihovo djelovanje uključuje izravnu neutralizaciju slobodnih radikala, keliranje prijelaznih metala, poput željeza i bakra, koji sudjeluju u katalizi stvaranja ROS-a, kao i modulaciju aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima, uključujući superoksid-dismutazu, katalazu i glutation-peroksidazu (SHAHIDI i AMBIGAIPALAN, 2015.).

U peradi su antioksidativni učinci tanina potvrđeni u više istraživanja, pri čemu se intenzitet i mehanizmi djelovanja razlikuju između HT-a i KT-a. Hidrolizirajući tanini, osobito oni podrijetlom iz drveta kestena, povezani su s povećanjem ukupnog antioksidativnog kapaciteta (T-AOC) te aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima, uključujući superoksid-dismutazu (SOD) i glutation-peroksidazu (GSH-Px). Istodobno je zabilježeno smanjenje koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu i tkivima tovnih pilića, što upućuje na smanjenu lipidnu peroksidaciju i ublažavanje oksidativnog stresa (LIU i sur., 2020.). Antioksidativni učinak taninske kiseline potvrđen je sniženim koncentracijama MDA u plazmi i tkivima brojlera (STARČEVIĆ i sur., 2015.). Nadalje, KT, primjerice iz *Acacia mearnsii*, pokazali su smanjenje stvaranja ROS-a i lipidne peroksidacije te povećanje razine neproteinskih tiola u crijevnoj sluznici i mišićnom tkivu brojlera (BOURCKHARDT i sur., 2025.b). Izravna usporedba različitih izvora tanina u pokusu na tovnim pilićima dodatno potvrđuje da i HT i KT mogu povećati T-AOC te aktivnost SOD-a, katalaze (CAT) i GSH-Px-a, uz smanjenje MDA-a, no s razlikama u intenzitetu odgovora, ovisno

o kemijskoj strukturi i izvoru tanina, što ukazuje na njihovo različito antioksidativno djelovanje u organizmu peradi (LIU i sur., 2023.)

2.4.4. Utjecaj tanina na morfologiju i funkciju crijeva

Kod tovnih pilića učinci tanina na morfologiju i funkciju crijeva uvelike ovise o njihovoj kemijskoj strukturi i primijenjenoj dozi.

Hidrolizirajući tanini u obroku dovode do smanjenja pH vrijednosti u ileumu i žljezdanom želucu, čime se može izmijeniti crijevna mikroflora i posredno utjecati na crijevnu funkciju. Istodobno su zabilježene promjene u relativnoj masi pojedinih organa povezanih s probavom i imunostimulacijskim sustavom, uključujući povećanje mase slezene, burze Fabricius i timusa (DANESHMAND KHORASGANI i sur., 2025.). Pored toga, HT mogu povoljno utjecati na kvalitetu mesa, potaknuti rast crijeva i poboljšati antioksidativni status tovnih pilića, no njihovi su učinci izrazito doza-ovisni budući da su pri višim koncentracijama (≥ 2.000 mg/kg) zabilježeni negativni učinci na proizvodne rezultate (BUYSE i sur., 2021.). U skladu s time, TOSI i sur. (2013.) pokazali su da tanini mogu ograničiti proliferaciju *Clostridium perfringens* i smanjiti težinu crijevnih oštećenja, dok su HIDAYAT i sur. (2021.) izvijestili o nepovoljnim učincima na proizvodne pokazatelje, masu limfoidnih organa i ilealnu probavljivost aminokiselina, zaključujući da njihova primjena u obroku zahtijeva poseban oprez.

Za razliku od HT-a, KT pokazuju konzistentnije i izraženije učinke na crijevnu morfologiju i funkciju. Istraživanja ukazuju na to da dodatak KT-a može poboljšati crijevnu morfologiju, pri čemu niže doze (100 mg/kg) ostvaruju povoljnije učinke u usporedbi s višim dozama (200 mg/kg), što dodatno naglašava važnost optimalnog doziranja (TANG i sur., 2021.). Osim toga, KT pokazuju pozitivan učinak na crijevnu funkciju i otpornost u uvjetima patogenog izazova, pri čemu je poboljšana crijevna morfometrija i očuvanje funkcionalnog integriteta crijeva u tovnih pilića izloženih infekciji bakterijom *Salmonella Heidelberg*, uz istodobno poboljšanje porasta tjelesne mase (MAYSONNAVE i sur., 2024.). Slični učinci zabilježeni su i pri primjeni KT-a putem vode za napajanje, pri čemu su poboljšanja crijevne morfologije i funkcije bila najizraženija u ranoj fazi tova i pri nižim dozama dodatka (BOURCKHARDT i sur., 2025.a).

U ostalih vrsta peradi, poput jarebica, dodatak KT-a nije značajno utjecao na proizvodne rezultate ni na relativnu masu većine probavnih organa, no zabilježeno je smanjenje mase debelog

crijeva (EŞKI i GÜLŞEN, 2025.), što upućuje na specifične i vrsti-ovisne učinke tanina na probavni sustav.

2.4.5. Imunomodulatorno djelovanje tanina

U peradi tanini pokazuju izražen imunomodulatorni potencijal, pri čemu se intenzitet i smjer učinaka razlikuju ovisno o kemijskoj strukturi, izvoru i primijenjenoj dozi. Istraživanja upućuju na to da dodatak HT-a ili pripravaka bogatih ovom skupinom spojeva može biti povezan sa smanjenjem ekspresije proupalnih citokina, uključujući IL-1 β , IL-6 i TNF- α , uz istodobno povećanje razine sekretornog imunoglobulina A (sIgA) i poboljšanje funkcije crijevne barijere u tovnih pilića (CHOI i KIM, 2020.). Nadalje, zabilježeno je i povećanje koncentracije protuupalnih medijatora, poput IL-10, kao i promjene u relativnoj masi limfoidnih organa, uključujući burzu Fabricii, timus i slezenu, osobito pri nižim dozama tanina, što upućuje na mogući učinak na razvoj i funkciju imunološkog sustava peradi (SERRANO i sur., 2009.; DANESHMAND KHORASGANI i sur., 2025.).

Taninska kiselina također pokazuje imunomodulatorni potencijal u peradi, koji se očituje modulacijom citokinskog profila, uključujući smanjenje ekspresije proupalnih citokina te povećanje razine sekretornog imunoglobulina A (sIgA) i poboljšanje funkcije mukozne barijere crijeva u tovnih pilića (XU i sur., 2025.).

Kondenzirani tanini, s druge strane, u peradi su češće povezani s izraženijim i dugotrajnijim učincima na lokalnu imunost crijeva, uglavnom posredovanim promjenama u sastavu crijevne mikrobiote i smanjenjem upalnih procesa. Takvi su učinci osobito zabilježeni u uvjetima patogenog izazova, primjerice tijekom infekcije *Clostridium perfringens*, u kojima je zabilježeno poboljšanje crijevnog zdravlja i blaži upalni odgovor (DIAZ CARRASCO i sur., 2018; REDONDO i sur., 2022).

Usporedna istraživanja u peradi dodatno potvrđuju da i HT i KT mogu povoljno utjecati na imunološke pokazatelje, uključujući citokinski profil i razinu imunoglobulina, no s razlikama u intenzitetu i vremenskoj dinamici odgovora, ovisno o tipu, izvoru i primijenjenoj dozi tanina (LIU i sur., 2023.).

2.4.6. Utjecaj tanina na proizvodne rezultate i kvalitetu mesa

U tovnih pilića dodatak tanina u hranidbi pokazuje učinak ovisan o dozi na proizvodne rezultate, pri čemu odgovor životinja uvelike ovisi o kemijskom obliku primijenjenih tanina. Hidrolizirajući tanini u niskim do umjerenim dozama u više su istraživanja povezani s očuvanim ili poboljšanim prirastom te učinkovitijom konverzijom hrane (LIU i sur., 2020.; ŽUŽUL i sur., 2026.). Suprotno tomu, HIDEYAT i sur. (2021.) navode da viši udjeli tanina u obroku mogu negativno utjecati na proizvodne pokazatelje brojlera, što potvrđuju i istraživanja u kojima su nepovoljni učinci najčešće zabilježeni pri razinama dodatka višim od 2.0 mg/kg hrane (SE i sur., 2021.). Dostupni znanstveni podaci upućuju na to da HT primijenjen u niskim do umjerenim dozama može povoljno utjecati na kvalitetu mesa tovnih pilića, ponajprije poboljšanjem oksidativne stabilnosti. Njihov dodatak povezan je sa smanjenom oksidacijom lipida u prsnom mišiću tijekom skladištenja, što se očituje nižim vrijednostima pokazatelja lipidne peroksidacije (MINIERI i sur., 2016.; LIU i sur., 2020.). Istraživanje STARČEVIĆ i sur. (2025.) upućuje na to da suplementacija s HT-om može doprinijeti smanjenju oksidacije lipida i boljem očuvanju n-3 masnih kiselina u svježem i smrznutom mesu peradi. Osim toga, pojedina istraživanja navode da HT mogu utjecati na lipidni sastav mesa, uključujući smanjenje udjela ukupnih lipida i kolesterola, bez negativnog utjecaja na osnovna tehnološka svojstva mesa (AL-HIJAZEEN i sur., 2016.; MINIERI i sur., 2016.). Pojedini autori izvještavaju da dodatak HT-a u preporučenim dozama ne uzrokuje promjene u pH vrijednosti, boji mesa ni sposobnosti zadržavanja vode (AL-HIJAZEEN i sur., 2016.; LIU i sur., 2020.).

Taninska kiselina pokazuje sličan obrazac djelovanja, pri čemu intenzitet učinka ovisi o primijenjenoj dozi. U niskim do umjerenim koncentracijama povezan je s poboljšanim ili očuvanim proizvodnim rezultatima tovnih pilića (MAŠEK i sur., 2014.), dok se pri višim razinama dodatka, primjerice oko 10 g/kg hrane, pozitivni učinci gube ili dolazi do pogoršanja proizvodnih pokazatelja. Takvi se nepovoljni učinci uglavnom pripisuju pojačanom vezanju proteina i smanjenoj probavljivosti hranjivih tvari (EBRAHIM i sur., 2015.). Unatoč tome, brojna istraživanja potvrđuju povoljan utjecaj taninske kiseline na sastav masnog tkiva brojlera, kako u uobičajenim uvjetima uzgoja (STARČEVIĆ i sur., 2015.), tako i tijekom izloženosti toplinskom stresu (EBRAHIM i sur., 2015.). Važno je pritom naglasiti da je učinak taninske kiseline izražen ovisan o dozi, pri čemu dodatak od 5 g/kg hrane može poboljšati završnu tjelesnu masu i konverziju

hrane (MAŠEK i sur., 2014.), dok se pri višoj razini dodatka od 10 g/kg hrane takav učinak više ne opaža (EBRAHIM i sur., 2015.).

Za razliku od HT-a, KT zbog svoje veće molekulske mase i stabilnije kemijske strukture pokazuju nešto drukčiji profil djelovanja. U niskim do umjerenim koncentracijama njihova je primjena u tovnih pilića često povezana s očuvanim proizvodnim rezultatima i poboljšanim crijevnim zdravljem, što se može posredno može odraziti na učinkovitiju konverziju hrane (MUELLER-HARVEY, 2006.; REDONDO i sur., 2022.). Međutim, pri višim razinama dodatka KT-a također se bilježe smanjen prirast i pogoršana konverzija hrane (MUELLER-HARVEY, 2006.; HIDAYAT i sur., 2021.). Nadalje, primjena sirovina bogatih KT-om, poput grožđanog tropa, povezana je sa sniženim vrijednostima pokazatelja oksidacije lipida (TBARS) u prsnom mišiću brojlera, što upućuje na produljenu održivost i očuvanu kvalitetu mesa (BRENES i sur., 2008.; CHAMORRO i sur., 2015.).

2.4.7. Utjecaj tanina na mikroklimatske čimbenike i dobrobit

Zahvaljujući svom adstringentnom učinku i sposobnosti modulacije crijevne mikrobiote, tanini mogu smanjiti sadržaj vlage u fecesu te ograničiti mikrobnu fermentaciju dušičnih i sumpornih spojeva. Posljedično se smanjuje, odnosno ograničava, emisija amonijaka (NH_3) i neugodnih sumpornih plinova, uključujući vodikov sulfid (H_2S) i metanetiol, što je potvrđeno u više eksperimentalnih i preglednih studija (BOSTAMI i sur., 2015.; AHMED i YANG, 2017.; CHOI i KIM, 2020.).

Kvaliteta stelje pritom predstavlja jedan od ključnih čimbenika dobrobiti u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji. Iako je dokazano da okolišni čimbenici, osobito povećana vlažnost stelje, značajno doprinose razvoju kontaktnog dermatitisa (TAIRA i sur., 2014.), uloga prehrane u njegovoj prevenciji još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. U tom se kontekstu tanini sve češće razmatraju kao potencijalna nutritivna strategija za ublažavanje problema u peradarskoj proizvodnji, uključujući negativne učinke na dobrobit tovnih pilića (CHOI i KIM, 2020.).

Kontaktni dermatitis predstavlja značajan problem dobrobiti jer uzrokuje bol i nelagodu te ograničava izražavanje prirodnih oblika ponašanja pilića (FREEMAN i sur., 2020.). Budući da je njegov razvoj rezultat složene interakcije okolišnih i hranidbenih čimbenika, prehrambeni dodaci s višestrukim biološkim učincima, poput tanina, mogu imati važnu ulogu u prevenciji ovog poremećaja. Pokazano je da tanini poboljšavaju konzistenciju fecesa i povećavaju sadržaj suhe

tvari, čime se poboljšava kvaliteta stelje i posljedično smanjuje učestalost kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu tovnih pilića (CHOI i sur., 2022).

Osim posrednog učinka preko stelje, smatra se da antimikrobna, antioksidativna i protuupalna svojstva tanina mogu dodatno pridonijeti ublažavanju težine lezija budući da su oksidativni stres i upalni procesi prepoznati kao važni čimbenici u razvoju i progresiji kontaktnog dermatitisa (MAYNE i sur., 2007.). CENGIZ i sur. (2017.) izvijestili su da dodatak taninske kiseline u obrok u dozi od 2.000 mg/kg značajno smanjuje i učestalost i težinu lezija kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu. Slično tome, REZAR i sur. (2014.) utvrdili su da HT povećavaju sadržaj suhe tvari u fecesu te time poboljšavaju uvjete stelje. Najnovija istraživanja dodatno potvrđuju da i HT i KT mogu povoljno utjecati na pojavnost kontaktnog dermatitisa u tovnih pilića (ŽUŽUL i sur., 2026.).

2.4.8. Sinergistički učinci tanina u prehrani peradi

Sve veći broj istraživanja potvrđuje da sinergistička kombinacija različitih kemijskih skupina tanina može znatno pojačati njihov biološki učinak u prehrani peradi u usporedbi s njihovom pojedinačnom primjenom. Posebno se ističe kombinacija KT-a i HT-a, koja u prehrani tovnih pilića ostvaruje izražene pozitivne učinke na zdravlje probavnog sustava.

Istraživanje REDONDO i sur. (2022.) pokazalo je da mješavina KT-a i HT-a značajno smanjuje učestalost i težinu makroskopskih lezija jejunuma uzrokovanih bakterijom *Clostridium perfringens*, što upućuje na zaštitni učinak tanina protiv nekrotičnog enteritisa. Osim toga, ova kombinacija povoljno utječe na sastav i raznolikost cecalne mikrobiote, pridonoseći stabilnosti crijevnog ekosustava.

Prema DÍAZ CARRASCO i sur. (2018.), zabilježeno je smanjenje relativne zastupljenosti roda *Bacteroides*, koji se često povezuje s disbiozom, uz istodobno povećanje korisnih pripadnika reda *Clostridiales*, osobito iz obitelji *Ruminococcaceae* i *Lachnospiraceae*. Ove bakterijske skupine poznate su po proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina te pozitivnom učinku na integritet i funkciju crijevne sluznice.

Navedeni rezultati potvrđuju da sinergističko djelovanje različitih tipova tanina predstavlja učinkovit nutritivni alat za poboljšanje zdravlja crijeva, smanjenje patogenog pritiska i unapređenje opće proizvodne učinkovitosti tovnih pilića, osobito u sustavima smanjene ili ukinute uporabe antibiotika.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Rezultati ovog doktorskog rada doprinijet će razjašnjavanju dosadašnjih nedovoljno istraženih i djelomično oprečnih spoznaja o mogućnostima primjene HT-a i KT-a u hranidbi tovnih pilića. Znanstveni doprinos rada ogleda se u produbljenom razumijevanju njihovih učinaka na proizvodne pokazatelje i zdravstveni status pilića u tovu, kao i u pojašnjenju razlika u mehanizmima njihova djelovanja.

3.1. Ciljevi

Cilj je ovog doktorskog rada usporediti učinke kondenziranih (quebracho) i hidrolizirajućih (kesten) tanina na proizvodne rezultate, zdravlje probavnog sustava, kvalitetu jestivih tkiva i imunosti sustav pilića u tovu.

Polazeći od navedenog općeg cilja istraživanja te uvažavajući postavljenu znanstvenu problematiku, definirani su sljedeći specifični ciljevi:

1. Utvrditi razlike u djelovanju HT i KT usporedbom njihovih učinaka na rast i konverziju hrane, antioksidativna i antimikrobna svojstva, sastav masnih kiselina, razinu oksidativnog stresa, ekspresiju upalnih gena, sastav crijevne mikrobiote, morfometriju crijeva te koncentraciju imunoglobulina u serumu i crijevnoj sluznici pilića u tovu.
2. Istražiti razinu i moguće razlike u *in vitro* antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima HT-a i KT-a te utvrditi povezanost između *in vitro* i *in vivo* rezultata, s ciljem jasnijeg definiranja mogućnosti njihove primjene kao egzogenih i endogenih antioksidansa i antimikrobnih tvari.
3. Analizirati učinke različitih tipova tanina na imunosti sustav i upalne procese radi detaljnijeg razumijevanja njihova utjecaja na zdravstveni status pilića tijekom tova.

3.2. Hipoteza

Pretpostavlja se da dodavanje HT-a i KT-a tanina u obrok pilića u tovu može pozitivno utjecati na rast, konverziju hrane, zdravlje probavnog sustava i imunološki status životinja, pri čemu se očekuje da će se ti učinci ostvarivati putem različitih mehanizama djelovanja, povezanih s modulacijom crijevne mikrobiote i regulacijom oksidativnih procesa.

4. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu na 7. redovitoj sjednici 19. veljače 2025., Klasa 640-01/25-18 Ur. broj 251-61-01/139-25-18.

4.1. Pokusne životinje

U istraživanju je korišteno 150 tovnih pilića hibrida Ross 308, podijeljenih u tri skupine po 50 životinja (pet replikacija po deset životinja). Životinje su bile držane na dubokoj stelji od sjeckane slame te u mikroklimatskim uvjetima karakterističnim za tov pilića.

4.2. Plan istraživanja

Pilići su nasumično raspoređeni u tri pokusne skupine: kontrolnu skupinu (komercijalna hrana za tovnje piliće), skupinu KT (0,75 g/kg kondenziranih tanina u obroku) te skupinu HT (0,75 g/kg hidrolizirajućih tanina u obroku). Kao izvor hidrolizirajućih tanina korišten je komercijalni pripravak Farmatan® (Tanin Sevnica, Slovenija), bogat hidrolizirajućim taninima, pretežno galotaninskog tipa, dobiven iz sirovina koje sadrže poligaloil-glukozu. Prema deklaraciji proizvođača, pripravak sadrži ≥ 70 % ukupnih tanina, uz prisutnost galne kiseline i manjih količina elaginske kiseline te drugih fenolnih spojeva. Kao izvor kondenziranih tanina korišten je komercijalni quebracho pripravak, bogat proantocijanidinima, dobiven iz drva vrsta roda *Schinopsis*.

Oba pripravka dodavana su u obrok u jednakoj koncentraciji od 0,75 g/kg krmne smjese, ravnomjernim miješanjem s komercijalnom hranom za tovnje piliće. Odabrana koncentracija temelji se na prethodnim istraživanjima koja ukazuju na potencijalne učinke tanina na zdravlje probavnog sustava i proizvodne rezultate perad.

Hrana i voda bili su dostupni ad libitum tijekom standardnog tova u trajanju od 42 dana. Sve skupine hranjene su uobičajenim krmnim smjesama u brašnastom obliku: početnom smjesom (starter) od 1. do 21. dana, smjesom za rast (grower) od 22. do 35. dana te završnom smjesom (finisher) od 36. do 42. dana. Sastav osnovne komercijalne hrane prikazan je u tablici 1., dok su pokusni tretmani prikazani na slici 3.

Po završetku pokusa (42. dan), životinje su usmrćene u komercijalnoj klaonici za perad, nakon čega su prikupljeni uzorci prsnog mišića (m. pectoralis superficialis) i mišića batka (m. iliotibialis cranialis), kao i dijelovi probavnog sustava (cekum i duodenum).

tablica 1. Kemijski sastav osnovne krmne smjese

Sirovine i kemijski sastav (%)	Početna (Starter) 1. do 21. dan	Porast (Grower) 22. do 35. dan	Završna (Finisher) (35. do 42. dan)
Sirovine			
Kukuruz	45,5	60,0	68,8
Pšenično brašno	12,5	3,0	–
Sojina sačma	21,5	12,5	18,0
Brašno lucerne	–	–	3,0
Kvasac	5,0	5,0	–
Suncokretova sačma	10,0	14,5	4,5
Biljno ulje	0,5	–	0,7
Premiks*	5,0	5,0	5,0
Kemijski sastav			
Sirova bjelančevina	22,12	20,91	19,35
Sirova mast	6,76	7,13	6,98
Sirova vlaknina	3,21	3,22	3,27
Kalcij	1,01	0,90	0,82
Fosfor	0,64	0,60	0,59
Lizin	1,38	1,22	1,09
Metionin	1,05	0,98	0,88
Metabolička energija (MJ)	12,44	13,04	13,45

*sadržaj na kg premiksa: Ca, 180 g; P, 50 g; Na, 23 g; metionin, 50 000 mg; lizin, 24 000 mg; retinol acetate, 90 mg; cholecalciferol, 1mg; DL- α -tocopheryl acetate, 600 mg; menadione, 40mg; thiamine hydrochloride, 20 mg; riboflavin sodium phosphate, 120 mg; pyridoxine, 40mg; cyanocobalamine, 300 μ g; C, 300 mg; niacin, 800 mg; calcium pantothenate, 240 mg; folic acid, 10mg, biotin, 2 mg; choline chloride, 10 g; Fe, 1200 mg; I, 1200 mg; Cu, 100 mg; Mn, 1600 mg; Co, 3mg; Zn, 1000 mg; Se, 3mg; BHT antioksidant, 3000 mg.

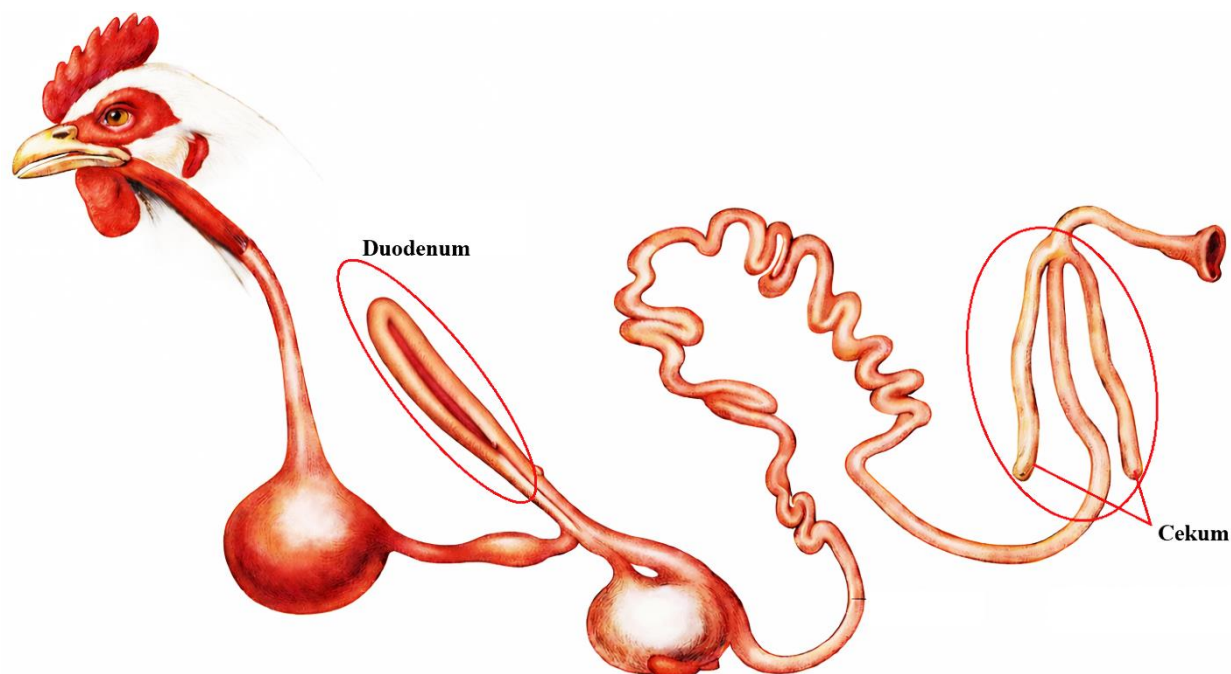
	Hrana	Dodatak
Kontrola	komercijalna hrana za tovne piliće	-
KT	komercijalna hrana za tovne piliće	0,75g/kg kondenziranih tanina u obroku
HT	komercijalna hrana za tovne piliće	0,75g/kg hidrolizirajućih tanina u obroku

slika 3. Pokusne skupine i tretmani (Izvor: autor)

4.3. Uzimanje uzoraka

Uzorci tkiva prikupljeni su na kraju pokusnog razdoblja. Uzorkovani su prsni mišić (*m. pectoralis superficialis*), mišić batka (*m. iliotibialis cranialis*), jetra te dijelovi probavnog sustava, uključujući duodenum i cekum (slika 4.). Komadići prsnog mišića i mišića batka veličine približno 2×2 cm uzimani su sterilnim skalpelom, dok je jetra prikupljena u cjelini. Uzorci mišića i jetre odmah su zamrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza. Dodatni fragmenti duodenuma i cekuma fiksirani su u 10 % puferiranoj otopini formalina za histološku obradu.

Za kvantifikaciju i filotipizaciju *E. coli* prikupljeno je po 45 g fecesa za svaku eksperimentalnu skupinu i svaku replikaciju. Uzorci fecesa odmah su smrznuti u tekućem dušiku te pohra njeni na -80 °C do mikrobiološke analize.



slika 4. Cekum i duodenum u probavnom sustavu pilića, prilagođeno prema (Pripremljeno prema: LOHMANN BREEDERS, 2025.)

4.4. Proizvodni rezultati

Proizvodni rezultati pilića praćeni su tijekom cijelog pokusnog razdoblja. Tjelesna masa životinja određivana je individualno, korištenjem precizne elektroničke vage, u pravilnim vremenskim razmacima od sedam dana (slika 5.). Vaganja su provedena u istom dnevnom terminu kako bi se smanjio utjecaj dnevnih oscilacija, a prije vaganja pilići nisu bili podvrgnuti dodatnim stresnim postupcima.

Tjedni prirasti tjelesne mase izračunati su kao razlika između tjelesne mase na početku i na kraju svakog kontrolnog razdoblja, dok je ukupan prirast određen kao razlika između početne i završne tjelesne mase tijekom cijelog pokusa. Unos hrane bilježen je po eksperimentalnoj jedinici tijekom istih vremenskih razdoblja, a konverzija hrane izračunata je kao omjer ukupne količine potrošene hrane i ostvarenog prirasta tjelesne mase u promatranom razdoblju. Dobiveni podaci o tjelesnoj masi, prirastu i konverziji hrane korišteni su za procjenu proizvodnih svojstava pilića i usporedbu između eksperimentalnih skupina.



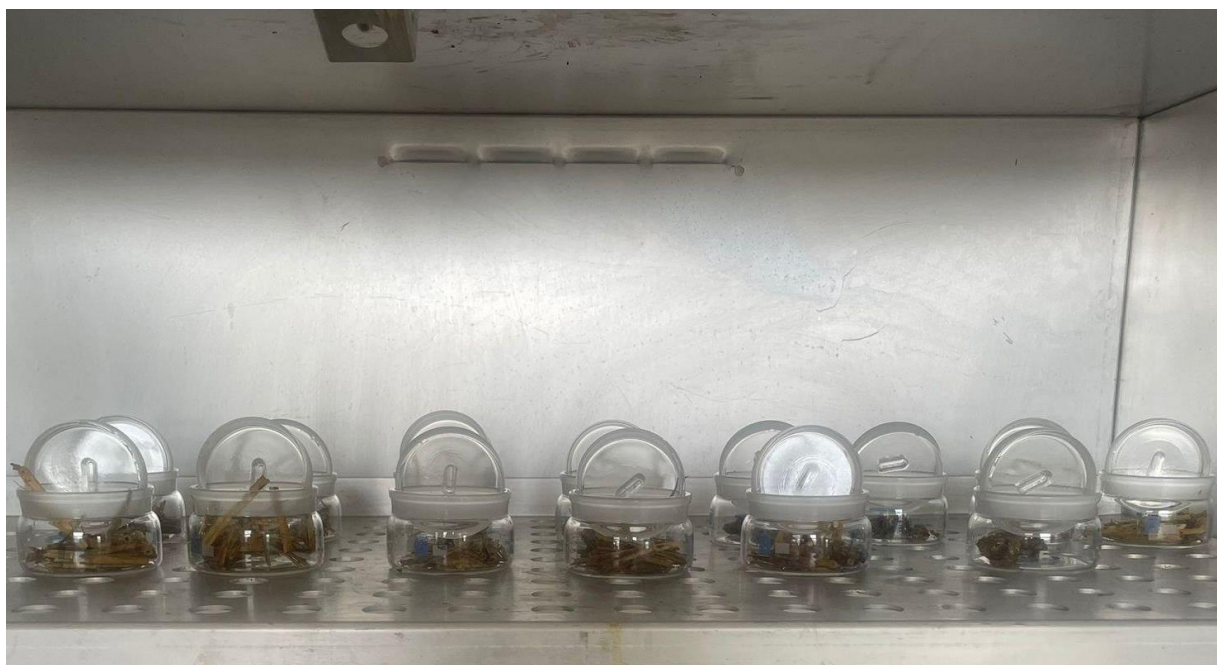
slika 5. Vaganje pilića (Izvor: autor)

4.5. Vlaga stelje

Stelja je uzorkovana na tri reprezentativna mjesta unutar svake eksperimentalne skupine pilića, nakon čega su uzorci istoga dana dostavljeni u laboratorij Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci stelje najprije su izvagani u vlažnom stanju, a zatim sušeni u termostatu, pri temperaturi od 105 °C, do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja uzorci su ponovo izvagani. Postupak sušenja stelje u termostatu prikazan je na slici 6.

Postotak vlage u stelji izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ vlage} = \frac{(\text{masa vlažne stelje} - \text{masa suhe stelje})}{\text{masa vlažne stelje}}$$



slika 6. Sušenje stelje u termostatu (Izvor: autor)

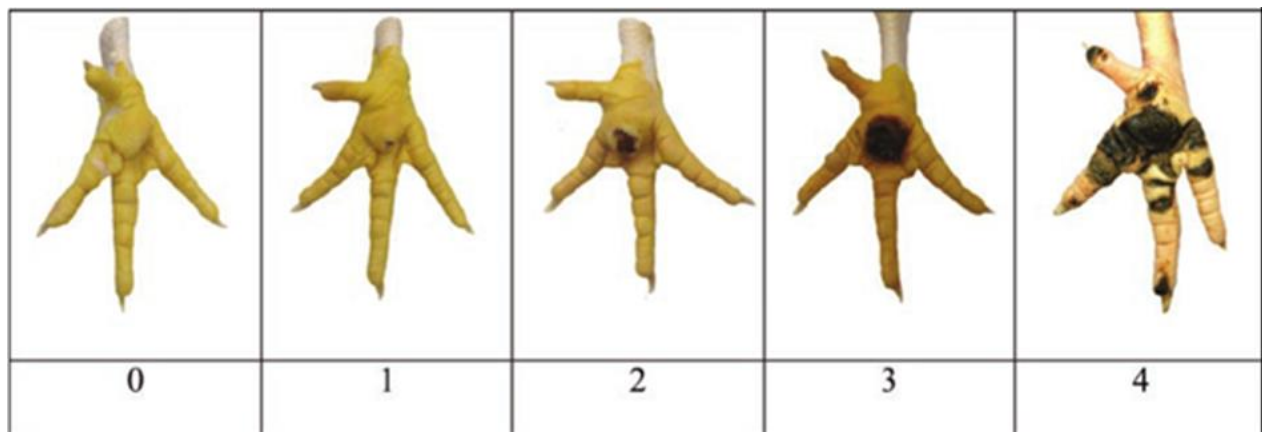
4.6. Koncentracija amonijaka

Koncentracija amonijaka određivana je u biozoni životinja na tri mjesta unutar svake skupine, koristeći univerzalan plinski detektor prema Dräger metodi.

Koncentracija amonijaka (NH₃) mjerena je u biozoni životinja na tri unaprijed određene mjerne točke unutar svake skupine, primjenom univerzalnog plinskog detektora prema Dräger metodi (Dräger, Njemačka). Uzorkovanje zraka provedeno je na visini koja odgovara biozoni životinja, pri čemu su mjerenja izvođena u istom dnevnom terminu kako bi se smanjila varijabilnost. Prije mjerenja uređaj je provjeren i/ili kalibriran sukladno uputama proizvođača, a za svako mjerno mjesto zabilježena je vrijednost koncentracije izražena u ppm. Za daljnju analizu korištena je srednja vrijednost tri mjerenja po skupini.

4.7. Pojavnost kontaktnih dermatitisa

U tjednim vremenskim razmacima kod svih pilića u svakoj skupini praćena je pojavnost kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu i tarzalnim zglobovima, sukladno Welfare Quality® protokolu (Welfare Quality® Consortium, 2009.; slike 7. i 8.). U slučajevima u kojima su na nogama pilića bile prisutne lezije različitog stupnja izraženosti u obzir su uzimane izraženije promjene.



slika 7. Skala za procjenu pojavnosti kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu pilića u tovu
(Izvor: WELFARE QUALITY® KONZORCIJ, 2009.)



slika 8. Skala za procjenu pojavnosti kontaktnog dermatitisa na tarzalnim zglobovima pilića u tovu (Izvor: WELFARE QUALITY® KONZORCIJ, 2009.)

4.8. Mortalitet

Mortalitet (%) je određen na temelju svakodnevnog praćenja eksperimentalnih skupina i sustavnog evidentiranja uginuća tijekom cijelog trajanja istraživanja. Životinje su svakodnevno pregledavane, pri čemu je provedena vizualna procjena općeg zdravstvenog stanja. Svaki slučaj uginuća evidentiran je uz pripadajući datum i oznaku eksperimentalne skupine, a uginule životinje uklonjene su u skladu s važećim biosigurnosnim i etičkim smjericama.

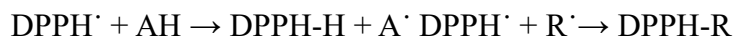
Mortalitet je izražen kao postotni udio uginulih životinja u odnosu na početni broj jedinki u pojedinoj skupini.

4.9. Antioksidativna svojstva HT-a i KT-a

Antioksidativna aktivnost HT i KT određena je DPPH i FRAP testom gdje je kao standard korišten butilirani hidroksitoluen (BHT) koji se u hrani za životinje koristi kao standardni antioksidans.

4.9.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala u etanolnoj otopini. Zbog nesparenog elektrona, DPPH radikal pokazuje snažnu apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm). U prisutnosti donora elektrona (AH), odnosno antioksidansa koji deaktivira slobodne radikale, dolazi do sparivanja elektrona DPPH radikala i promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu. Ta promjena prati se mjerenjem smanjenja apsorpcije (BRAND-WILLIAMS et al., 1995.).



U 100 μL otopine spojeva različitih koncentracija dodano je 100 μL DPPH otopine ($c(\text{DPPH}) = 200 \mu\text{mol/L}$), nakon čega su uzorci ostavljeni 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Konačna koncentracija DPPH radikala u svakom uzorku iznosila je 100 $\mu\text{mol/L}$. Promjena apsorpcije mjerena je na ELISA čitaču pri 517 nm, dok je 96 %-tni etanol korišten kao slijepa proba.

Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrijednost, odnosno koncentracija antioksidansa potrebna za 50 % inhibicije DPPH radikala. Niža IC_{50} vrijednost ukazuje na veću antioksidacijsku učinkovitost. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

4.9.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda temelji se na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u intenzivno plavi kompleks Fe(II)-TPTZ pri niskom pH. Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron, a promjena se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 593 nm (BENZIE i STRAIN, 1996.). Redukcijska sposobnost antioksidansa proporcionalna je intenzitetu razvijene boje. FRAP reagens pripremljen je miješanjem 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mL TPTZ otopine (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u 40 mM HCl i 20 mL 300 mM acetatnog pufera. Na mikrotitarskoj

ploči pomiješano je 10 μL otopine spoja koncentracije 4 mM i 200 μL FRAP reagensa, nakon čega je apsorbancija izmjerena pri 593 nm u odnosu na slijepu probu, nakon inkubacije od četiri minute. Slijepa proba pripremljena je identično kao uzorci, uz zamjenu 10 μL uzorka istim volumenom etanola. Apsorbancija slijepa probe oduzeta je od apsorbancije uzorka, a tako dobivena razlika korištena je za izračun konačnih rezultata.

Antioksidacijska aktivnost određena je primjenom baždarne krivulje konstruirane za standard $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda ($\mu\text{mol/L}$). Određivanje je provedeno u tri paralelne probe, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost u $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{mg}$ spoja. Za izradu baždarnog pravca pripremljene su otopine $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u etanolu u pet različitih koncentracija.

4.10. Analiza sastava masnih kiselina

Masne kiseline analizirane su u uzorcima tkiva prsnog mišića i batka. Svi uzorci prethodno su homogenizirani ručnim homogenizatorom (Polytron, Kinematica GMBH, Luzern, Švicarska). Ukupni lipidi izolirani su korištenjem mješavine kloroforma i metanola (HPLC grade, Sigma Aldrich, Njemačka) u omjeru 2:1 (v/v), prema metodi Folch i sur. (1957.). Nakon ekstrakcije lipidi su osušeni pod strujom dušika, otopljeni u 150 μL ekstrakcijske otopine i pohranjeni na -80°C do analize.

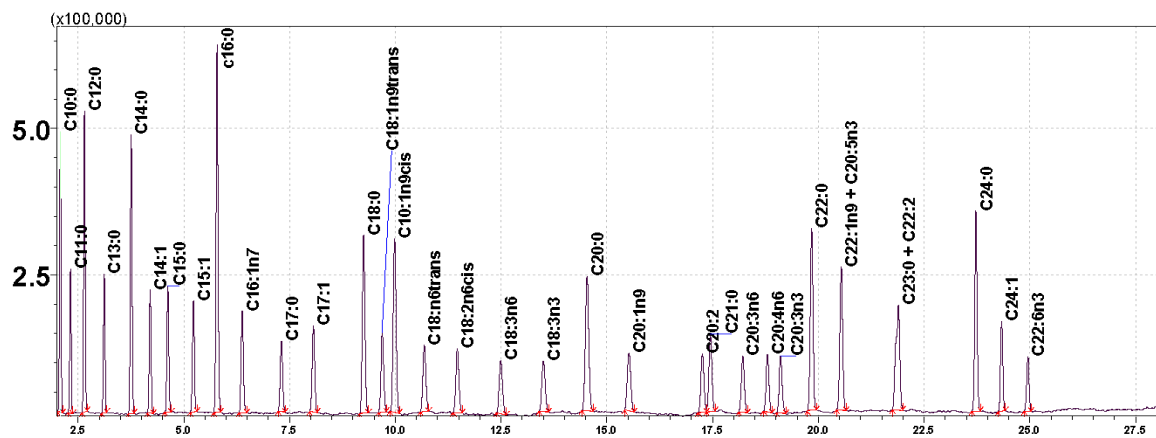
Metilni esteri masnih kiselina pripremljeni su primjenom 2M KOH (200 μL) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi (Petrović i sur., 2010.). Dobiveni metilni esteri ekstrahirani su dodatkom 1 mL heksana.

Nakon ekstrakcije metiliranih masnih kiselina heksanom pripremljeni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom s masenom detekcijom (GC-MS; QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan). Uvjeti analize prikazani su u tablici 2.

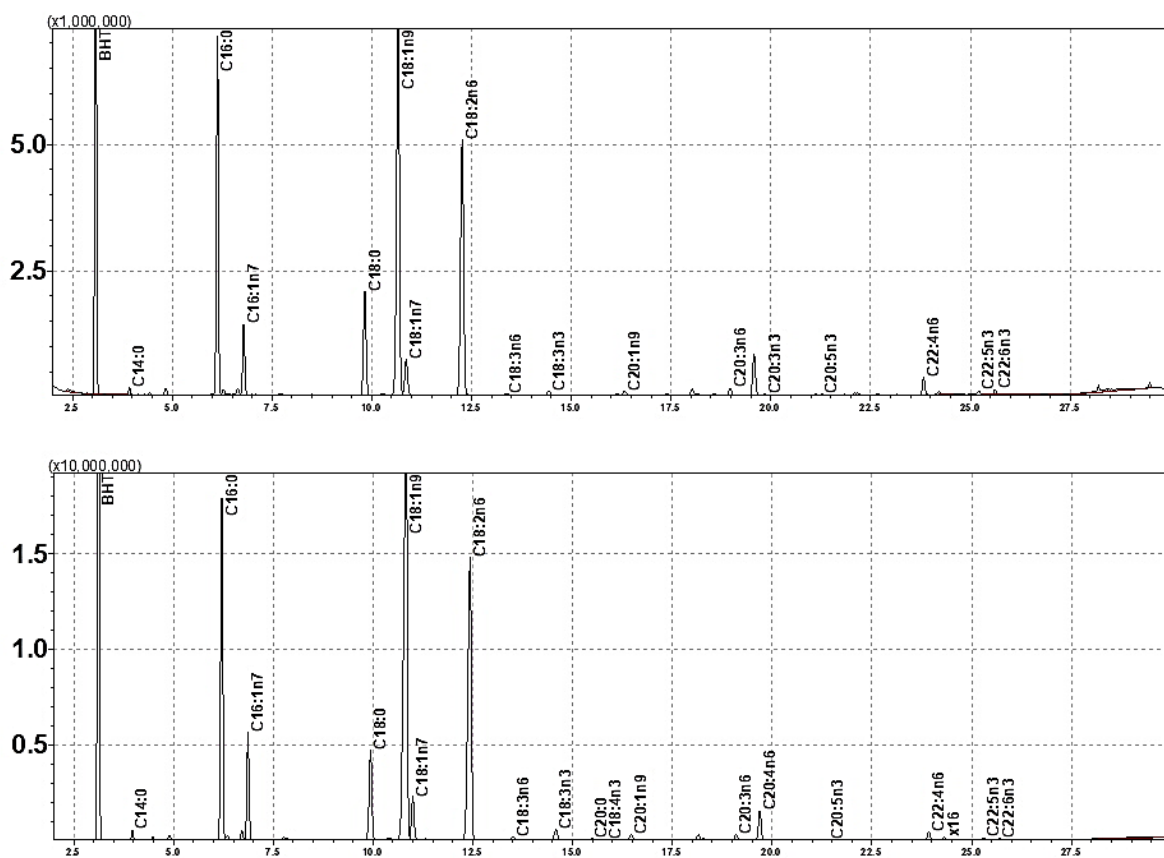
tablica 2. Uvjeti tijekom analize plinske kromatografije s masenom detekcijom MS

Parametar	Specifikacija
Kolona	BPX70 kapilarna kolona (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 μm film; SGE, Austin, TX, USA)
Plin nosilac	Helij (5.0)
Linearna brzina plina	35 cm/s
Volumen injektiranja	1 μL
Split omjer	80:1
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura interfacea	250 °C
Temperatura izvora iona	225 °C
Program pećnice	150 °C (1 min) → 1 °C/min do 180 °C (2 min) → 5 °C/min do 220 °C
Način rada GC–MS	Scan
Raspon m/z	45–400

Identifikacija masnih kiselina provedena je korištenjem eksternog standarda (37 Component FAME Mix) te usporedbom s dostupnim bazama podataka masenih spektara (npr. Wiley). Kvantifikacija je obavljena normalizacijom površina pikova uz primjenu internog standarda (C23:0). Rezultati su izraženi kao postotni udio pojedine masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama. Kromatogram standarda 37 Component FAME mix (Supelco, Bellfonte, PA, USA) korišten za identifikaciju masnih kiselina prikazan je na slici 9. Reprezentativni kromatogrami tkiva *m. iliotibialis cranialis* i *m. pectoralis superficialis* prikazan je na slici 10.



slika 9. Kromatogram standarda 37 Component FAME mix (Supelco, Bellfonte, PA, USA) korišten za identifikaciju masnih kiselina

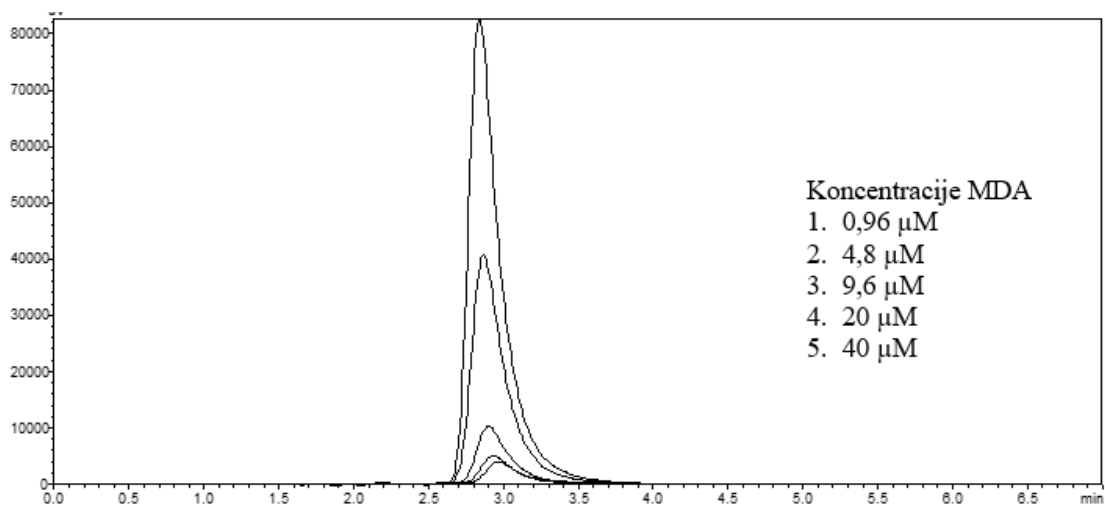


slika 10. Reprezentativni kromatogrami tkiva *m. iliotibialis cranialis* i *m. pectoralis superficialis*

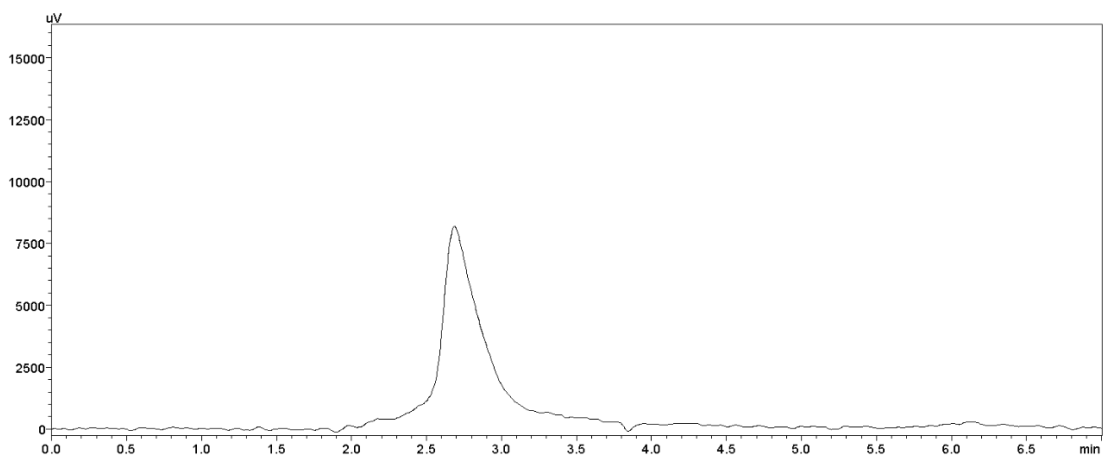
4.11. Analiza koncentracije MDA u mišićnom i jetrenom tkivu

Koncentracija MDA u tkivima određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) na uređaju Shimadzu 2010 (Shimadzu, Japan). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu nastaje crveno obojen kompleks tiobarbiturne kiseline i reaktivnih supstanci (TBARS), čija se koncentracija kvantificira kromatografskom analizom (Grotto i sur., 2007.). Standardne otopine pripravljene su iz komercijalne 4 M otopine tetraetoksipropana (TEP; 1,1,3,3-tetraethoxypropane, ≥ 96 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), koji služi kao prekursor MDA. Početna standardna otopina dobivena je dodavanjem 50 μL TEP-a u 50 mL etanola (HPLC grade, $\geq 99,8$ %, Sigma-Aldrich, Njemačka). Radne standardne otopine pripremane su svježe svakog dana, neposredno prije analize, pipetiranjem odgovarajućih volumena početne otopine u odmjerne tikvice volumena 5 ili 10 mL. Koncentracije TEP-a u radnim standardima iznosile su 0,96 μM , 4,8 μM , 9,6 μM , 20 μM i 40 μM (slika 11. A i B).

A)



B)



slika 11. A) Preklopljeni kromatogrami standarda MDA korišteni za generiranje kalibracijske krivulje i B) Reprezentativni kromatogram koncentracije MDA (TBARS) u tkivu jetre

Svi uzorci tkiva nakon odmrzavanja homogenizirani su ručnim homogenizatorom (Polytron, Kinematica GmbH, Luzern, Švicarska). Nakon homogenizacije 150 mg svakog uzorka tkiva preneseno je u epruvetu, nakon čega je dodano 50 μL destilirane vode (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Njemačka) i 50 μL 3 N NaOH. Sadržaj epruvete miješan je na vortex mješalici tijekom jedne minute te inkubiran u vodenoj kupelji na 60 °C tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije dodano je 250 μL 6 % H_3PO_4 i 250 μL 0,8 % otopine TBA, a uzorci su ponovo miješani vortexiranjem tijekom jedne minute. Slijedila je inkubacija u vodenoj kupelji na 90 °C tijekom 45 minuta. Nakon hlađenja uzorcima je dodano 250 μL metanola, kratko promiješano vortexiranjem, te 100 μL 10 % otopine natrijeva dodecil-sulfata. Epruvete su potom centrifugirane u mikrocentrifugi pri $3600 \times g$ tijekom deset minuta. Dobiveni supernatant prenesen je u viala za HPLC analizu. Uvjeti kromatografske analize (kolona, mobilna faza, protok, detekcijska valna duljina i volumen injekcije) prikazani su u tablici 3.

tablica 3. Uvjeti tijekom mjerenja na kromatografu

Parametar	Specifikacija
Kromatograf	HPLC sustav Shimadzu LC2010CHT
Detektor	UV-Vis, 532 nm
Kolona	InertSustain C18 (4.6 \times 150 mm, 5 μm ; GL Sciences Inc., Japan)
Mobilna faza	50 mM KH_2PO_4 (u destiliranoj vodi, HPLC grade) : metanol (HPLC grade, $\geq 99.9\%$) = 50:50 (v/v)
Protok mobilne faze	1 mL/min
Injekcijski volumen	20 μL
Temperatura kolone	37 °C

4.12. Analiza ekspresije gena imunološkog odgovora i proupalnih gena

Ekspresija gena *TLR4*, *TNF α* i *IL6* analizirana je u uzorcima tkiva jetre. Za izolaciju ukupne RNA iz tkiva jetre korišten je komercijalni komplet za izolaciju RNA (SV Total RNA Isolation System, Promega®, SAD), u skladu s uputama proizvođača.

Koncentracija i čistoća izdvojene ukupne RNA određene su spektrofotometrijskom analizom na uređaju BioDrop μ LITE (BioDrop, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Čistoća RNA procijenjena je na temelju omjera apsorbancija pri valnim duljinama 260 i 280 nm (A260/A280). Pripremljena razrjeđenja RNA (50 μ g/ml) podvrgnuta su reverznoj transkripciji i kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) u jednom koraku, koristeći One-Step TB Green PrimeScript RT-PCR set II (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan). RT-qPCR analizom ispitana je ekspresija ciljnih gena, pri čemu su sekvence početnica prikazane u tablici 4.

tablica 4. Početnice ispitivanih gena od interesa

Gen	Sekvenca 5' – 3'	Sekvenca 3' – 5'
<i>TLR4</i>	GTCTCTCCTTCCTTACCTGCTGTT C	AGGAGGAGAAAGACAGGGTAGGTG
<i>TNFα</i>	AGCGTTGTCTGCTCTGTAGC	CCTGCTGGGGGAATGCTAGG
<i>IL6</i>	CAAGGTGACGGAGGAGGAC	TGGCGAGGAGGGATTTCT
β -Actin	CAACACAGTGCTGTCTGGTGG	ATCGTACTCCTGCTTGCTGAT
GAPDH	GCTAAAGGCCGCACCAGT	GGAGCTCCATGGTCAGAAAC

Svaka RT-qPCR reakcija ukupnog volumena 20 μ L sadržavala je:

1. 2 \times One-Step TB Green RT-PCR pufer 4 (10,0 μ L)
2. PrimeScript 1-step Enzyme Mix 2 (0,8 μ L)
3. Početnice za ispitivane gene (0,8 μ L)
4. Sterilnu destiliranu vodu bez RNaza (RNase-free water; 5,2 μ L)
5. ROX referentnu boju (0,4 μ L)
6. RNA uzorak (2,0 μ L)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu provedena je na uređaju Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, SAD), pri uvjetima amplifikacije navedenima u tablici 5.

tablica 5. Uvjeti RT-qPCR reakcija

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / s	Broj ciklusa
Reverzna	42	300	1
transkripcija	95	10	1
	95	5	40
PCR reakcija	60	40	40
	72	60	40
	95	60	1
Protokol disocijacije	55	30	1
	95	30	1

Sve Ct vrijednosti dobivene u kvantitativnoj PCR reakciji korištene su za izračunavanje relativne promjene ekspresije cDNK gena od interesa pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Metodom $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) analizirana je i kvantificirana ekspresija gena, prema genu za normalizaciju (*engl. housekeeping gene*, β -aktinu i GAPDH), te je pomoću $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti izračunat faktor promjene ekspresije gena (*engl. fold change*). Ekspresija je izračunata prema formuli:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{T \text{ ciljni gen P}} - C_{T \text{ gen za normalizaciju P}}) - (C_{T \text{ ciljni gen K}} - C_{T \text{ gen za normalizaciju K}})$$

K – kontrolna skupina; P – pokusna skupina

Pomoću izračunate $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti izračunati je faktor promjene (*engl. fold change*) ekspresije gena od interesa u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli:

$$\text{Relativna promjena} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Dobiveni broj označava koliko je puta ekspresija mRNA gena od interesa pokusne skupine veća ili manja u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.13. Kvantifikacija fekalne *E. coli*

Svaki uzorak fecesa bio je razrijeđen sterilnom fiziološkom otopinom u omjeru 1:2, iz čega su pripremljena serijska razrjeđenja od 10^{-3} do 10^{-8} za potrebe uzgoja. Iz svakog razrjeđenja izdvojeno je 100 μL i naneseo na Brilliance UTI Clarity kromogene agar ploče (Oxoid, Basingstoke, UK), nakon čega je sadržaj ravnomjerno razvučen sterilnom petljom od 10 μL (Golias, Ljubljana, Slovenija).

Sve ploče inkubirane su u aerobnim uvjetima na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije ploče su fotografirane, a broj bakterijskih kolonija određen je pomoću softvera IC Measure v1.0.

Za daljnju analizu odabrane su reprezentativne ploče koje su sadržavale između 20 i 400 kolonija. Za svako ponavljanje izračunat je broj kolonija koji je izražen kao CFU po gramu fecesa, što je predstavljalo konačan rezultat.

4.14. Morfometrija crijeva

Segmenti duodenuma i cekuma podvrgnuti su rutinskoj histološkoj obradi, koja je uključivala dehidraciju, uklapanje u parafin te izradu histoloških rezova debljine 5 μm . Dobiveni rezovi bojani su hematoksilinom i eozinom (H&E) te korišteni za mikroskopsku analizu. Za svaku životinju pripremljeno je i analizirano najmanje pet histoloških presjeka obojenih H&E metodom.

Visina crijevnih resica određena je mjerenjem duljine deset intaktnih resica po uzorku. Visina resica, dubina kripte te debljina muskularisa mukoze mjerene su pomoću računalnog softvera za analizu slike (ImageJ). Na temelju dobivenih mjerenja izračunat je omjer visine resica i dubine kripte.

4.15. Određivanje sekretornog IgA u sluznici crijeva metodom ELISA

Koncentracija sekretornog imunoglobulina A (sIgA) u sluznici crijeva određena je ELISA testom, korištenjem komercijalno dostupnog kita (Chicken IgA ELISA Kit, Abcam, Cambridge, MA, SAD), u skladu s uputama proizvođača. Uzorci sluznice crijeva homogenizirani su u odgovarajućem puferu, a dobiveni homogenati centrifugirani su radi uklanjanja krutih čestica. Supernatant je korišten za daljnju analizu. Koncentracije sIgA u uzorcima izračunate su interpolacijom sa standardne krivulje te su normalizirane na ukupnu količinu proteina u uzorku. Konačni rezultati izraženi su kao ng sIgA po mg ukupnih proteina (ng/mg proteina). Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

4.16. Statistička obrada podataka

Za određivanje veličine uzorka provedena je analiza snage (power analysis) pomoću programa G*Power (FAUL i sur., 2007.), što je omogućilo odabir optimalnog broja jedinki s obzirom na željenu statističku značajnost i stupanj pouzdanosti. Analiza je bila temeljena na rezultatima prethodnih istraživanja (vlastitih i dostupnih u literaturi, pretraživanjem baze PubMed), pri čemu su kao parametri bili postavljeni statistička snaga od 0,8 i razina značajnosti $p < 0,01$. Glavne varijable u analizi bile su masa pilića i sastav masnih kiselina, koje su poslužile za procjenu potrebne veličine uzorka, s ciljem osiguravanja statističke pouzdanosti rezultata. Prema rezultatima analize utvrđen je potreban broj od pet replikacija po deset životinja za svaki tretman (ukupno 50 životinja po skupini i 150 životinja u istraživanju).

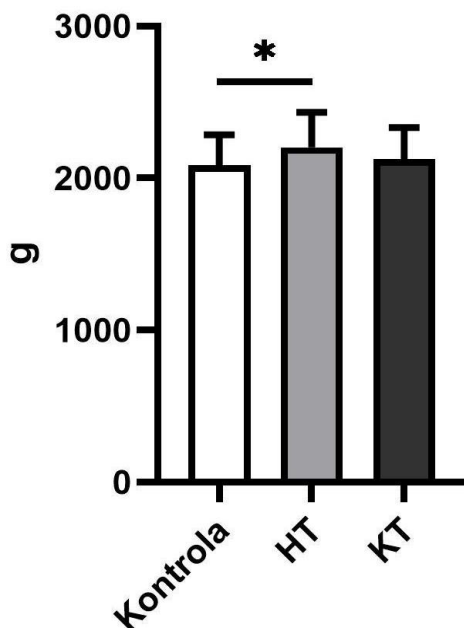
Eksperimentalni rezultati analizirani su pomoću programa GraphPad Prism 8. Normalnost raspodjele podataka provjerena je primjenom Shapiro–Wilksovog testa. Razlike između skupina analizirane su analizom varijance (ANOVA) uz primjenu Tukeyjevog post hoc testa. Različiti efekti ispitani su faktorijskom analizom varijance i višestrukom regresijom, dok su korelacijski odnosi određeni Spearmanovim testom korelacije ili Pearsonovim koeficijentom korelacije. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razina statističke značajnosti za sve provedene analize postavljena je na $p < 0,05$, osim ako nije drugačije navedeno.

5. REZULTATI

Rezultati su podijeljeni u cjeline sukladno postavljenom cilju i provedenom istraživanju. Proizvodni rezultati prikazani su na slikama 12.–14. Koncentracija amonijaka prikazana je u tablici 6. Pojavnost kontaktnih dermatitisa prikazana je u tablici 7. Antioksidativna svojstva tanina, tj. vrijednosti DPPH i FRAP, prikazane su na slici 15. A i B. Sastav masnih kiselina prikazan je u tablici 8. Koncentracije MDA u *m. pectoralis superficialis*, *m. iliotibialis cranialis*, jetri i serumu prikazane su na slikama 16. A i B te 17. A i B. Ekspresija gena TLR4, IL6 i TNF α u jetri prikazana je na slici 18. A, B i C. Kvantifikacija fekalne *E. coli* te morfometrija crijeva prikazane su na slici 19., odnosno na slici 20. A i B, dok su rezultati ELISA analize sekretornog IgA sluznice crijeva prikazani na slici 21. Mortalitet životinja i vlaga stelje prikazni su opisno.

5.1. Proizvodni rezultati

Tjelesna masa pilića u skupini HT bila je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Između kontrolne skupine i skupine KT nije utvrđena statistički značajna razlika u tjelesnoj masi ($p > 0,05$), kao ni između skupina HT i KT ($p > 0,05$) (slika 12.).

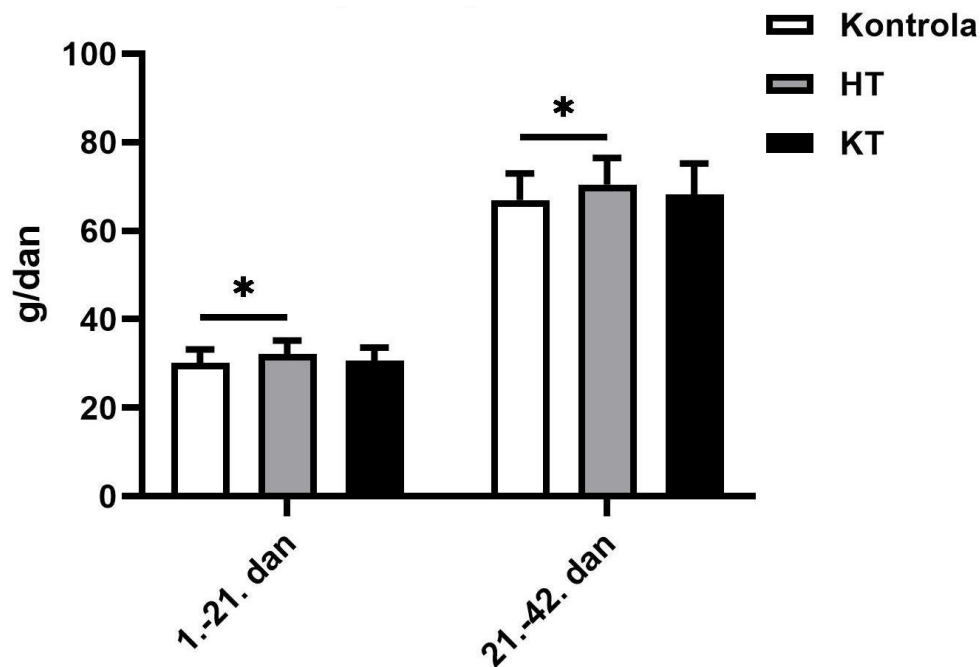


slika 12. Tjelesna masa tovnih pilića 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

$p < 0,05$ * označava statistički značajnu razliku između kontrolne skupine

U razdoblju od 1. do 21. dana istraživanja tjelesni prirast bio je značajno veći ($p < 0,05$) u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu, dok između kontrolne skupine i skupine KT te između skupina HT i KT nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (slika 13.).

U razdoblju od 21. do 42. dana istraživanja tjelesni prirast bio je značajno veći ($p < 0,05$) u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu. Između kontrolne skupine i skupine KT, kao i između skupina HT i KT, nisu utvrđene statistički značajne razlike u tjelesnom prirastu ($p > 0,05$) (slika 13.).

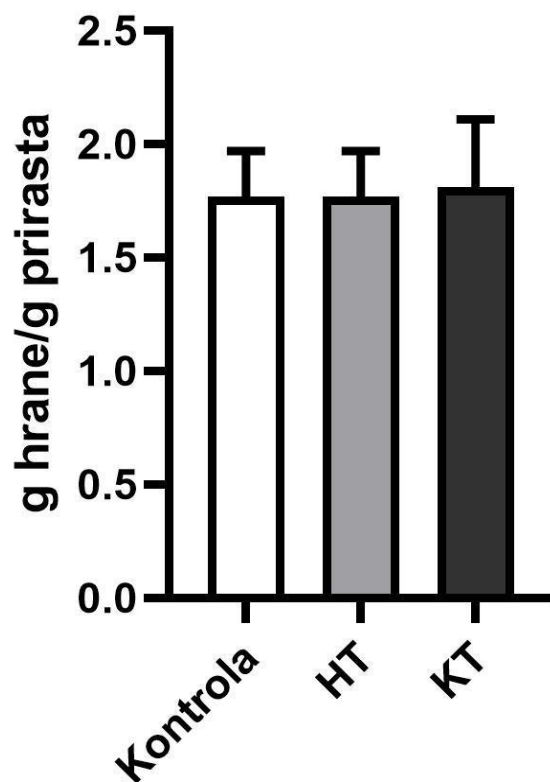


slika 13. Tjelesni prirast tovnih pilića (g/dan) u razdoblju od 1. do 21. dana te od 21. do 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) i pokusnim skupinama HT i KT

(arit. sred. \pm SD)

$p < 0,05$ * označava statistički značajnu razliku između skupina

Konverzija hrane u razdoblju od 1. do 42. dana istraživanja nije se značajno razlikovala ($p > 0,05$) između istraživanih skupina (slika 14.).



slika 14. Konverzija hrane (g hrane/g prirasta) u razdoblju od 1. do 42. dana istraživanja u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. ± SD)

5.2. Vlaga stelje

Vlaga stelje bila je značajno niža u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Također, u skupini HT utvrđen je značajno niži sadržaj vlage stelje u usporedbi sa skupinom KT ($p < 0,05$).

5.3. Koncentracija amonijaka

Koncentracija amonijaka od 21. dana nadalje bila je značajno niža u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), pri čemu je u skupini KT zabilježena značajno niža vrijednost u usporedbi sa skupinom HT ($p < 0,05$) (tablica 6.).

tablica 6. Koncentracija amonijaka (ppm) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

Skupina	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan	42. dan
Kontrola	$2,0 \pm 0,0^a$	$1,7 \pm 0,3^a$	16 ± 0^a	16 ± 0^a	$6,7 \pm 2,9^a$	$5,0 \pm 0,0^a$	$5,0 \pm 0,0^a$
HT	$2,0 \pm 0,0^a$	$2,0 \pm 0,0^b$	16 ± 0^a	$10 \pm 0,0^b$	$10 \pm 0,0^b$	$8,3 \pm 2,9^b$	$10 \pm 0,0^b$
KT	$2,0 \pm 0,0^a$	$1,7 \pm 0,3^a$	16 ± 0^a	$5,0 \pm 0,0^c$	$5,0 \pm 0,0^c$	$4,0 \pm 1,7^c$	$5,0 \pm 0,0^c$

^{a,b,c} vrijednosti unutar istog reda označene različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

5.4. Pojavnost kontaktnih dermatitisa

Učestalost kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu od 14. dana nadalje bila je značajno niža u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), pri čemu je u skupini KT do 28. dana utvrđena značajno niža učestalost u usporedbi sa skupinom HT ($p < 0,05$) (tablica 7.).

Učestalost kontaktnog dermatitisa na tarzalnim zglobovima od 21. dana nadalje bila je značajno niža u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok između skupina HT i KT nije utvrđena statistički značajna razlika u većini promatranih razdoblja ($p > 0,05$) (tablica 7.).

tablica 7. Učestalost kontaktnog dermatitisa na jastučićima nogu i tarzalnim zglobovima u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

<i>Kontaktni dermatitis na jastučićima nogu</i>			
Dan	Kontrola	HT	KT
14.	0.53 ± 0.25^a	0.27 ± 0.24^b	0.05 ± 0.00^c
21.	1.67 ± 0.48^a	1.23 ± 0.43^b	0.43 ± 0.20^c
28.	2.40 ± 0.50^a	2.00 ± 0.33^b	1.43 ± 0.51^c
35.	2.77 ± 0.43^a	2.23 ± 0.43^b	2.30 ± 0.47^b
42.	3.00 ± 0.18^a	2.53 ± 0.50^b	2.60 ± 0.50^b
<i>Kontaktni dermatitis na tarzalnim zglobovima</i>			
21.	1.00 ± 0.18^a	0.77 ± 0.43^b	0.83 ± 0.37^a
28.	2.00 ± 0.24^a	1.73 ± 0.44^b	1.77 ± 0.43^b
35.	3.00 ± 0.33^a	2.43 ± 0.50^b	2.40 ± 0.49^b
42.	3.60 ± 0.49^a	3.00 ± 0.26^b	2.97 ± 0.31^b

^{a,b,c} vrijednosti unutar istog reda označene različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

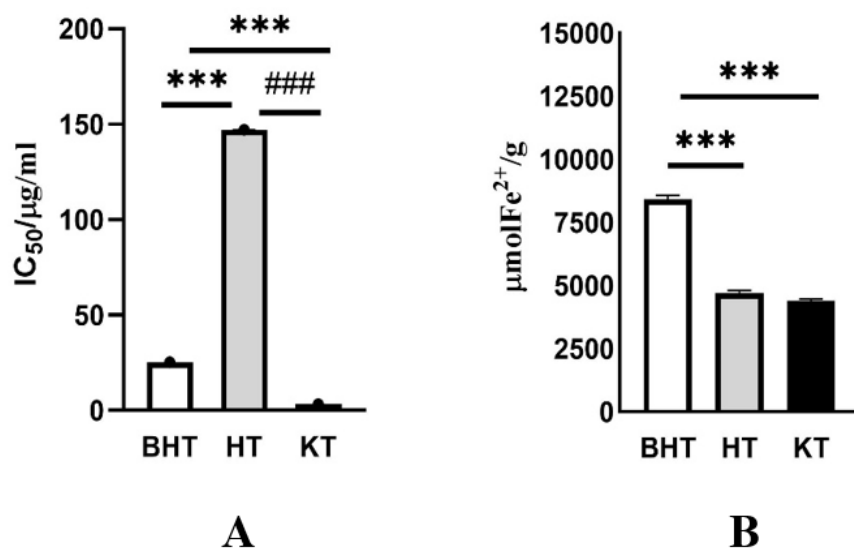
5.5. Mortalitet

Tijekom istraživanja nije zabilježeno uginuće pilića ni u jednoj ispitivanoj skupini.

5.6. Antioksidativna svojstva HT i KT

U DPPH testu, izraženom kao IC_{50} vrijednost ($\mu\text{g/mL}$), u skupini KT utvrđena je značajno niža IC_{50} vrijednost u odnosu na standard BHT i skupinu HT ($p < 0,001$). U skupini HT utvrđena je značajno viša IC_{50} vrijednost u odnosu na standard BHT ($p < 0,001$) (slika 15.A).

FRAP analiza pokazala je da skupine HT i KT imaju značajno nižu redukcijsku sposobnost, izraženu kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, u usporedbi sa standardom BHT ($p < 0,001$), dok između skupina HT i KT nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (slika 15.B).



slika 15. Vrijednosti DPPH (A) i FRAP (B) u razdoblju od 1. do 42. dana istraživanja u pokusnim skupinama HT i KT u odnosu na BHT standard (arit. sred. \pm SD)

*** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ označavaju statistički značajne razlike između skupina

5.7. Sastav masnih kiselina

Sastav masnih kiselina u mišiću *m. iliotibialis cranialis* nije se značajno razlikovao između ispitivanih skupina za većinu pojedinačnih masnih kiselina (tablica 8.). Međutim, udio linolne kiseline (C18:2n6) bio je značajno viši u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Također, udio dokozaheksaenske kiseline (C22:6n3) bio je značajno viši u skupini HT u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom KT ($p < 0,05$). Nadalje, udio n-6 masnih kiselina bio značajno

viši u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Omjer C22:5n3/C22:6n3 bio je značajno viši u skupini HT u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom KT ($p < 0,05$).

tablica 8. Sastav masnih kiselina u mišiću *m. iliotalibialis cranialis* u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

	Kontrola	HT	KT
C12:0	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
C14:0	0,34 \pm 0,05	0,38 \pm 0,07	0,32 \pm 0,04
C15:0	0,12 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03
C16:0	18,91 \pm 1,78	17,71 \pm 0,18	17,03 \pm 1,61
C16:1n7	1,90 \pm 0,79	1,65 \pm 0,73	1,83 \pm 0,32
C17:0	0,17 \pm 0,07	0,16 \pm 0,04	0,16 \pm 0,06
C18:0	8,07 \pm 1,36	7,73 \pm 0,81	7,40 \pm 1,15
C18:1n9	34,40 \pm 3,83	34,35 \pm 2,89	34,00 \pm 3,37
C18:1n7	1,52 \pm 0,22	1,47 \pm 0,23	1,70 \pm 0,28
C18:2n6	30,52 \pm 1,98 ^a	32,62 \pm 1,92 ^{ab}	33,44 \pm 0,89 ^b
C20:1n9	0,29 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04	0,25 \pm 0,01
C20:3n6	0,35 \pm 0,05	0,34 \pm 0,06	0,37 \pm 0,06
C20:4n6	2,31 \pm 0,69	2,13 \pm 0,63	2,36 \pm 1,14
C22:4n6	0,77 \pm 0,19	0,74 \pm 0,26	0,76 \pm 0,38
C22:5n3	0,23 \pm 0,07	0,17 \pm 0,05	0,19 \pm 0,12
C22:6n3	0,08 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,03 ^b	0,07 \pm 0,01 ^a
PUFA	34,27 \pm 2,43	36,18 \pm 2,86	37,19 \pm 1,32
SFA	27,44 \pm 3,04	25,95 \pm 0,99	24,87 \pm 2,74
MUFA	38,12 \pm 4,76	37,71 \pm 3,87	37,78 \pm 3,41
n3	0,31 \pm 0,06	0,35 \pm 0,08	0,26 \pm 0,12
n6	33,96 \pm 2,38 ^a	35,83 \pm 2,84 ^{ab}	36,93 \pm 1,22 ^b
C22:5n3/C22:6n3	0,38 \pm 0,11 ^a	1,13 \pm 0,13 ^b	0,48 \pm 0,20 ^a

^{a,b} vrijednosti unutar istog reda označene različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

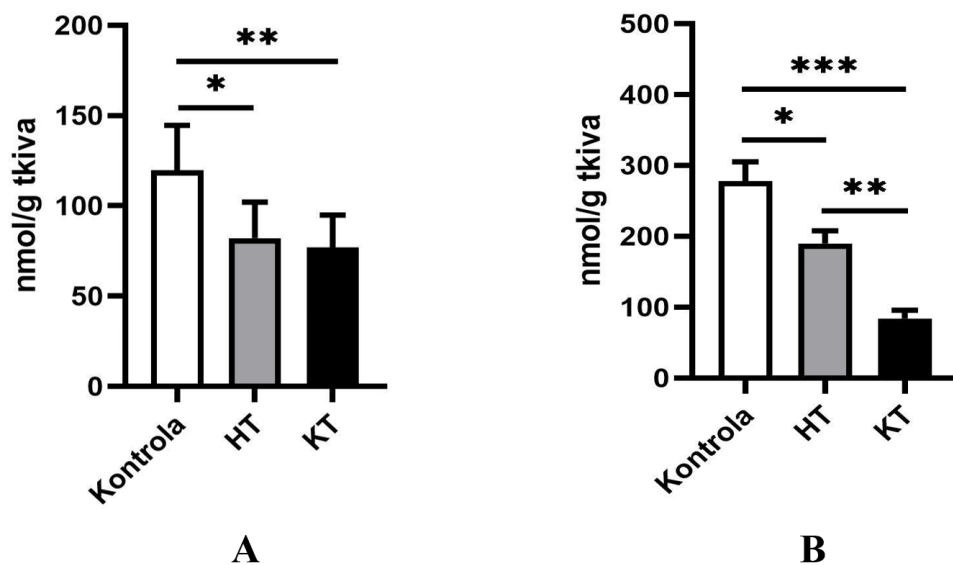
5.8. Koncentracije MDA

Koncentracija MDA u mišiću *m. pectoralis superficialis* bila je značajno niža u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), kao i u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$), dok između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 16.A).

Koncentracija MDA u mišiću *m. iliotibialis cranialis* bila je značajno niža u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok je u skupini KT utvrđena značajno niža koncentracija MDA u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,001$). Također, koncentracija MDA bila je značajno niža u skupini KT u odnosu na skupinu HT ($p < 0,01$) (slika 16.B).

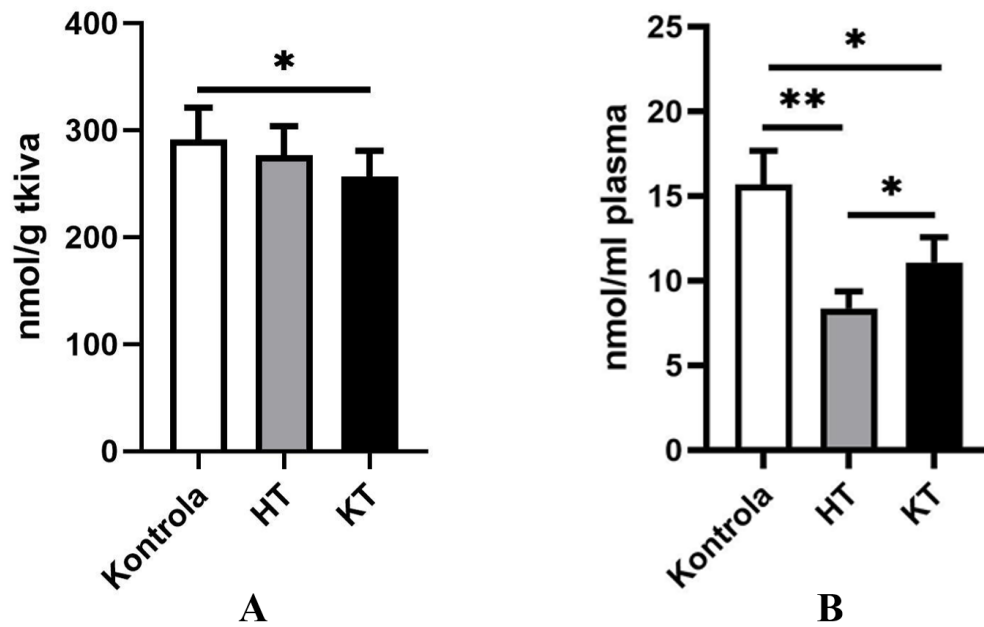
U jetri je u skupini KT utvrđena značajno niža koncentracija MDA u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok između kontrolne skupine i skupine HT, kao i između skupina HT i KT, nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji MDA ($p > 0,05$) (slika 17.A).

U serumu je u skupini HT utvrđena značajno niža koncentracija MDA u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,01$), dok je u skupini KT koncentracija MDA također bila značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Također, koncentracija MDA u skupini HT bila je značajno niža u odnosu na skupinu KT ($p < 0,05$) (slika 17.B).



slika 16. Koncentracija malondialdehida (MDA; nmol/g tkiva) u mišiću *m. pectoralis superficialis* (A) i u mišiću *m. iliotibialis cranialis* (B) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ označavaju statistički značajne razlike između skupina



slika 17. Koncentracija malondialdehida (MDA) u jetri (nmol/g tkiva) (A) i serumu (nmol/ml plazme) (B) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

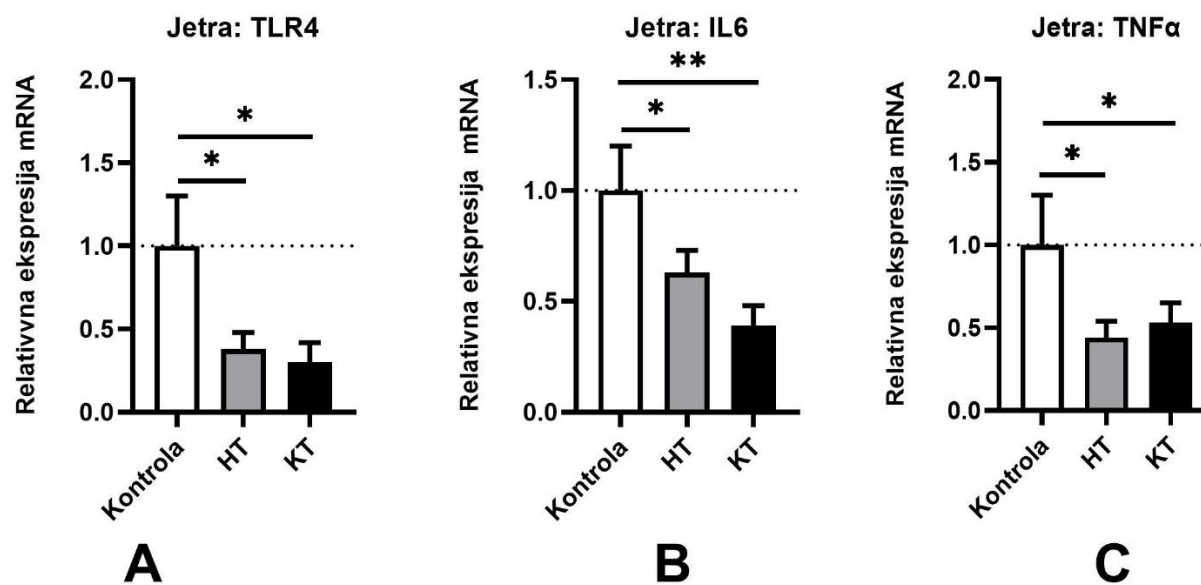
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ označavaju statistički značajne razlike između skupina

5.9. Ekspresija proinflamatornih gena u tkivu jetre

Ekspresija gena TLR4 u jetri bila je značajno niža u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), kao i u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 18.A).

Ekspresija gena IL6 u jetri bila je značajno niža u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok je u kontrolnoj skupini utvrđena značajno viša ekspresija IL6 u usporedbi s KT skupinom ($p < 0,01$). Između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 18.B).

Ekspresija gena TNF α u jetri bila je značajno niža u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), kao i u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 18.C).

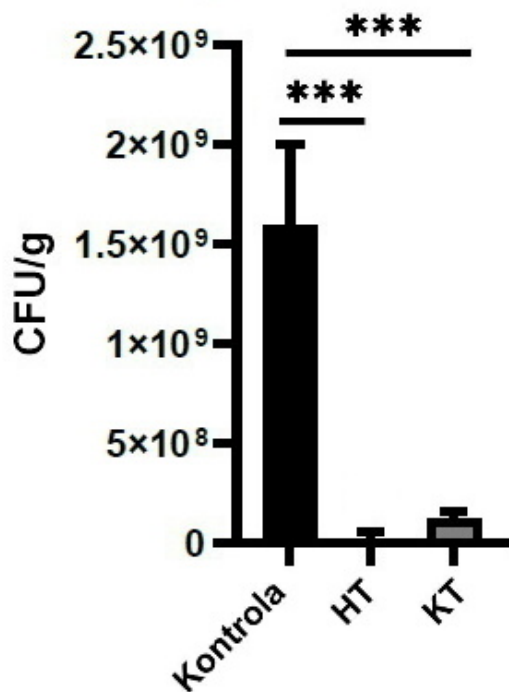


slika 18. Ekspresija gena TLR4 (A), IL6 (B) i TNF α (C) u jetri u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ označavaju statistički značajne razlike između skupina

5.10. Kvantifikacija fekalne *E. coli*

Broj *E. coli* u izmetu bio je značajno niži u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$). Također, u skupini HT utvrđen je značajno niži broj *E. coli* u usporedbi sa skupinom KT ($p < 0,001$) (slika 19).



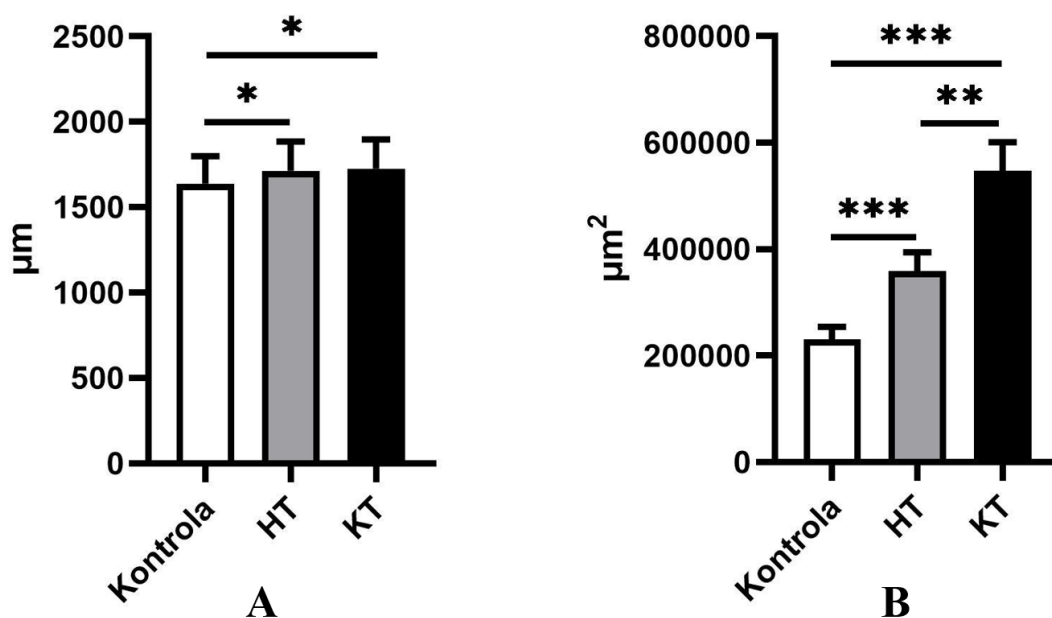
slika 19. Broj *Escherichia coli* u izmetu (CFU/g) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

*** $p < 0,001$ označava statistički značajne razlike između skupina

5.11. Morfometrija crijeva

Duljina resica jejunuma bila je značajno veća u skupini HT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), kao i u skupini KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$), dok između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 20.A).

Površina resica jejunuma bila je značajno niža u kontrolnoj skupini u odnosu na skupine HT i KT ($p < 0,001$). Također, značajno niža površina resica utvrđena je i u skupini HT u odnosu na skupinu KT ($p < 0,01$) (slika 20.B).

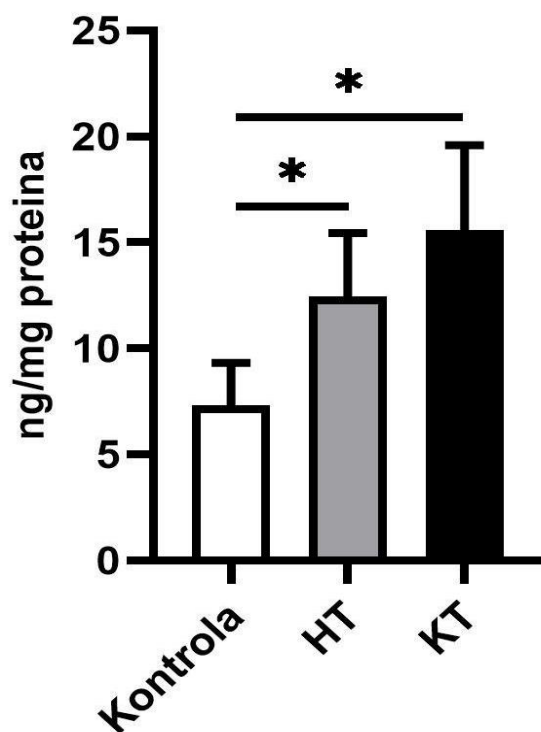


slika 20. Duljina (A) i površina (B) resica jejunuma u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ označavaju statistički značajne razlike između skupina

5.12. ELISA sekretorni IgA sluznice crijeva

Koncentracija ELISA sekretornog IgA sluznice ileuma bila je značajno viša u skupinama HT i KT u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$). Između skupina HT i KT nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji sIgA (slika 21.).



slika 21. Koncentracija ELISA sekretornog IgA sluznice ileuma (sIgA; ng/mg proteina) u kontrolnoj skupini (Kontrola) te u pokusnim skupinama HT i KT (arit. sred. \pm SD)

* $p < 0,05$ označava statistički značajne razlike između skupina

6. RASPRAVA

Tanini, kao biljni polifenolni spojevi, posljednjih godina privlače sve veću pozornost zbog svog potencijalnog djelovanja na zdravlje i proizvodnost tovnih pilića. U ovom doktorskom radu istraživana je učinak HT-a i KT-a primijenjenih u nižim dozama, s ciljem sagledavanja njihova djelovanja na proizvodne rezultate, pojavnost kontaktnih dermatitisa, oksidativni status, sastav masnih kiselina, crijevnu mikrobiotu, imunski odgovor i morfometriju crijeva.

U ranijim istraživanjima tanini su uglavnom smatrani antinutritivnim tvarima zbog njihova nepovoljnog utjecaja na hranidbenu vrijednost obroka, što je rezultiralo smanjenjem proizvodnosti te uvelike ograničilo njihovu primjenu u hranidbi životinja (MUELLER-HARVEY, 2006.; RAMAH i sur., 2020.; KHAJALI i RAFIEL, 2024.). Takav stav proizlazio je iz brojnih istraživanja u kojima su opisani mehanizmi negativnog djelovanja tanina, uključujući vezanje bjelančevina sa smanjenjem probavljivosti proteina i inhibicijom aktivnosti probavnih enzima (MEDUGU i sur., 2012.), adstringentni okus hrane koji smanjuje njezinu ukusnost i posljedično unos hrane (BUTLER i sur., 1984.), stvaranje kompleksa sa željezom koje dovodi do smanjenja koncentracije željeza u plazmi (LEE i sur., 2010.) te povećanje proteolitičke aktivnosti u jetri (MARZO i sur., 2002.). Međutim, unatoč jasno definiranim ograničenjima njihove primjene, sve veći broj, osobito novijih, istraživanja pokazuje da tanini ne djeluju isključivo antinutritivno, već da u određenim uvjetima mogu ostvariti i povoljan učinak na proizvodnost životinja (MUELLER-HARVEY, 2006.; MAŠEK i sur., 2014.; LIU i sur., 2020.; REDONDO i sur., 2022.; BATELLI i sur., 2024.; ŽUŽUL i sur., 2026.). Takvi nalazi upućuju na potrebu reinterpretacije dosadašnjeg pogleda na djelovanje tanina, pri čemu se njihovi učinci ne mogu promatrati kao jednoznačni, već ovisе o uvjetima primjene. Jedan od ključnih čimbenika koji određuje smjer djelovanja tanina jest njihova doza. Iako je jasno da previsoke doze mogu imati nepovoljan učinak, umjerene doze u obroku mogu rezultirati poboljšanjem proizvodnih pokazatelja. Međutim, definiranje optimalne doze i dalje predstavlja izazov budući da na učinak tanina istodobno utječu njihova kemijska struktura, vrsta i fiziološko stanje životinje te sastav obroka. Prema dostupnim spoznajama, učinkovita razina HT-a u hrani za životinje procjenjuje se u rasponu od 0,5 do 5 g/kg hrane (CHOI i KIM, 2020.). Doze primijenjene u ovom istraživanju bile su bliže donjoj granici navedenog raspona (0,75 g/kg), što je upućivalo na mogućnost ostvarivanja pozitivnog učinka na proizvodne pokazatelje, a takav je učinak i potvrđen dobivenim rezultatima. Važno je, međutim, naglasiti da je povoljan učinak na proizvodne pokazatelje ostvaren isključivo pri primjeni HT-a, dok primjena KT-a nije rezultirala

statistički značajnim promjenama u promatranim proizvodnim pokazateljima. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da HT i KT posjeduju različite mehanizme djelovanja, što se očituje i u njihovu različitom utjecaju na proizvodne rezultate tovni pilića. Navedeno dodatno naglašava važnost razmatranja ne samo doze, već i vrste tanina pri njihovoj primjeni u hranidbi peradi.

Tanini se sve češće razmatraju kao dodatak hrani s potencijalom za ublažavanje problema u intenzivnoj proizvodnji peradi, uključujući negativne učinke na dobrobit tovni pilića (CHOI i KIM, 2020.). Visoke koncentracije amonijaka u objektima peradi predstavljaju veliki izazov kao uzrok respiratornog oštećenja, uključujući oštećenje cilija u dišnim putevima i povećano stvaranje sluzi, te negativno utječu na zdravlje, proizvodne rezultate i cjelokupnu dobrobit životinja (LIU i sur., 2020.). SEPPERER i sur. (2020.) upućuju na to da tanini mogu učinkovito smanjiti emisiju amonijaka iz stajskog gnoja djelovanjem na pH i kemijsko vezanje dušikovih spojeva. U ovom istraživanju koncentracija amonijaka bila je niža u pilića hranjenih HT-om i KT-om u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu je u skupini KT-a zabilježena značajno niža vrijednost u usporedbi sa skupinom HT-a. Nadalje, kontaktni dermatitis, koji uzrokuje bol i ograničava prirodno ponašanje, značajan je problem u tovu pilića (FREEMAN i sur., 2020.), a njegova pojava povezana je s okolišnim i hranidbenim čimbenicima. Tanini, zahvaljujući antimikrobnim, antioksidativnim i protuupalnim svojstvima, mogu poboljšati konzistenciju fecesa i kvalitetu stelje te time smanjiti učestalost i težinu pododermatitisa (CHOI i sur., 2022.; MAYNE i sur., 2007.). U ovom istraživanju skupine koje su primale tanine imale su značajno nižu vlagu stelje i blaže lezije kontaktnih dermatitisa u usporedbi s kontrolnom skupinom, pri čemu su KT-i pokazali izraženiji učinak u ranijoj fazi tova, dok su od 28. dana obje skupine imale i blaže lezije kontaktnog dermatitisa na tarzalnim zglobovima. Ovi rezultati upućuju na to da dodatak tanina može smanjiti pojavnost kontaktnih dermatitisa te tako pridonijeti boljem zdravlju, cjelokupnoj dobrobiti tovni pilića, ali i boljoj proizvodnosti.

Tanini se ubrajaju u snažne prirodne antioksidanse, ponajprije zbog visokog udjela fenolnih skupina koje im omogućuju neutralizaciju slobodnih radikala, smanjenje oksidativnog stresa te inhibiciju lipidne peroksidacije (RICE-EVANS i sur., 1997.; RUDRAPAL i sur., 2022.). Njihov antioksidativni učinak ne očituje se isključivo izravnim hvatanjem ROS-a, već je povezan i s interakcijama s bjelančevinama, čime tanini mogu utjecati na probavljivost i biološku dostupnost hranjivih tvari (NUAMAH i sur., 2024.). Dodatno, tanini imaju sposobnost keliranja dvovalentnih metalnih iona, poput željeza i bakra, koji sudjeluju u katalizi oksidativnih reakcija putem

Fentonovih i srodnih mehanizama (TRUONG i JEONG, 2021.). Smanjenjem bioraspoloživosti tih prooksidativnih metala tanini mogu značajno doprinijeti smanjenju oksidativnih oštećenja u biološkim sustavima (COSME i sur., 2025.). Međutim, antioksidacijski učinak tanina uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, stupnju polimerizacije i vrsti fenolnih podjedinica, zbog čega se HT-i i KT-i mogu značajno razlikovati u mehanizmima djelovanja i učinkovitosti u pojedinim antioksidacijskim testovima. Usporedba rezultata dobivenih DPPH i FRAP metodama omogućuje dublji uvid u razlike između HT-a i KT-a. U ovom je istraživanju usporedba HT-a i KT-a pokazala jasne razlike u njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti ovisno o primijenjenoj metodi. Tako su KT-i pokazali značajno višu DPPH aktivnost u odnosu na HT-e, što se očitalo nižim IC_{50} vrijednostima. Ovakav rezultat može se pripisati njihovoj polimernoj strukturi bogatoj flavan-3-olnim jedinicama i velikom broju fenolnih hidroksilnih skupina koje učinkovito sudjeluju u donaciji vodikovih atoma te stabilizaciji slobodnih radikala (HAGERMAN i sur., 1998.; PRIOR i sur., 2005.). Suprotno tome, HT-i su pokazali slabiju neutralizaciju slobodnih DPPH radikala, što je u skladu s literaturom koja navodi da sterička ograničenja i prisutnost esterificiranih struktura u ellagitanninima i gallotanninima mogu smanjiti dostupnost reaktivnih fenolnih skupina za reakciju s DPPH radikalom (FRAGA i sur., 2010.). U FRAP testu nisu uočene značajne razlike između HT-a i KT-a, što upućuje na to da oba tipa tanina posjeduju usporedivu sposobnost prijenosa elektrona i redukcije Fe^{3+} iona. Ovakav nalaz potvrđuje da redukcijska sposobnost tanina ne ovisi isključivo o stupnju polimerizacije, već i o ukupnom fenolnom sadržaju i prisutnosti redoks-aktivnih funkcionalnih skupina (BENZIE i STRAIN, 1996.; APAK i sur., 2016.). Dobiveni rezultati naglašavaju da razlike između HT-a i KT-a postaju izraženije u testovima temeljenim na mehanizmu hvatanja slobodnih radikala, dok su u testovima redukcijske sposobnosti njihove aktivnosti usporedive. Time se potvrđuje važnost primjene više komplementarnih metoda pri procjeni antioksidacijskog potencijala tanina različite strukturne prirode.

S obzirom na izražen antioksidativni učinak, može se pretpostaviti da tanini doprinose smanjenju oksidacije masnih kiselina u tkivima, čime posredno utječu i na njihov sastav. Masne kiseline najpodložnije oksidaciji su dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) iz n3 i n6 linija (SANTOS-FILHO i sur., 2005.), pri čemu su dugolančane n3 masne kiseline, poput dokozaheksaenske (DHA) i eikozapentaenske (EPA), od posebnog nutricionističkog značaja. Stoga je pronalaženje dodataka hrani koji mogu spriječiti oksidaciju ovih masnih kiselina od posebnog interesa u hranidbi tovanih životinja namijenjenih proizvodnji namirnica životinjskog podrijetla.

Iako se relativno mali broj istraživanja dosad bavio ovim područjem, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da tanini mogu utjecati na sastav masnih kiselina u tkivima, pri čemu je učinak bio izražen ovisan o vrsti tanina. Dodatak HT-a rezultirao je povećanjem koncentracije DHA te značajnim povećanjem omjera DHA/C22:5n3, što upućuje na pojačanu biokonverziju DHA iz njezinih prekursora. Nasuprot tome, dodatak KT-a doveo je do povećanja koncentracije n6 masnih kiselina, bez utjecaja na n3 masne kiseline. Ovakvi suprotni učinci različitih vrsta tanina u skladu su s nalazima drugih istraživanja. Pozitivan utjecaj HT-a na sastav masnih kiselina iz n3 linije u tkivima tovine peradi zabilježen je i pri primjeni tanina kestena (STARČEVIĆ i sur., 2025.) te taninske kiseline (STARČEVIĆ i sur., 2015.). Suprotno tome, istraživanja KT-a primijenjenih putem pitke vode pokazuju povećanje koncentracije linolne kiseline i ukupnih n6 masnih kiselina (BOURCKHARDT i sur., 2025.b). Potpuno razumijevanje i objašnjenje ovih suprotnih učinaka zahtijeva daljnja istraživanja molekularnih mehanizama kojima različite vrste tanina utječu na metabolizam lipida te procese sinteze i biokonverzije masnih kiselina n3 i n6 linije. Uz izravan utjecaj tanina na metabolizam masnih kiselina, buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti i na razlike u antioksidativnim svojstvima pojedinih vrsta tanina, kako bi se jasnije razlučili mehanizmi odgovorni za uočene učinke.

Antioksidativni kapacitet fenolnih spojeva može se procjenjivati *in vivo* smanjenjem nastanka produkata lipidne peroksidacije, među kojima se MDA najčešće koristi kao pokazatelj oksidativnog oštećenja lipida. Rezultati ovog istraživanja pokazali su smanjenje koncentracije MDA u serumu i u tkivima, pri čemu je učinak ovisio o vrsti primijenjenih tanina. Hidrolizirajući tanini smanjili su koncentraciju MDA u serumu u većoj mjeri u odnosu na KT, dok su u tkivima oba tipa tanina pokazala podjednako smanjenje koncentracije MDA. Ovakvo poboljšanje antioksidativnog statusa jedan je od najkonzistentnijih nalaza zabilježenih pri primjeni tanina u hranidbi životinja. Slični učinci opisani su pri hranidbi peradi KT (BOURCKHARDT i sur., 2025.b), HT (BUYSE i sur., 2021.; STARČEVIĆ i sur., 2025.) te taninskom kiselinom (MAŠEK i sur., 2014.; STARČEVIĆ i sur., 2015.). Pozitivan utjecaj tanina na antioksidativni status, neovisno o njihovoj vrsti i izvoru, može se smatrati jednim od najstabilnijih učinaka njihove primjene u hrani ili vodi. Ipak, jačina tog učinka značajno varira ovisno o čitavom nizu čimbenika. Uz dozu tanina, kao ključni čimbenici ističu se i njihov kemijski sastav te izvor. Istraživanja u kojima su istodobno ispitivani vrsta i izvor tanina upućuju na to da sam izvor tanina, odnosno biljna vrsta iz koje su izolirani, ima veći utjecaj na antioksidativna svojstva nego podjela na HT i KT (LIU i sur., 2023.).

Ovakvi nalazi sugeriraju da je kemijska struktura tanina u biljci, kao i struktura spojeva nastalih tijekom izolacije te njihovi razgradni produkti unutar organizma, od presudne važnosti za određivanje njihove biološke učinkovitosti. Osim navedenih čimbenika, uočena je i povezanost između dobi životinja, odnosno razdoblja tova, i promjena koncentracije MDA. U istraživanju BOURCKHARDT i sur. (2025.a) primjena KT-a putem pitke vode rezultirala je sniženom koncentracijom MDA u tkivima mesa i crijeva tijekom drugog dijela tova (21. – 42. dan), dok u ranijem razdoblju tova (1. – 21. dan) razlike nisu bile statistički značajne. Ovi rezultati dodatno naglašavaju složenost djelovanja tanina te potrebu za razmatranjem njihove primjene u odnosu na fiziološki status životinje.

Pri razmatranju funkcionalnih svojstava tanina kao dodataka hrani posebno se ističu njihova protuupalna i imunomodulatorna djelovanja, koja imaju ključnu ulogu u očuvanju crijevne homeostaze. U ovom su istraživanju, stoga, analizirani proupalni citokini, ekspresija receptora nalik Tollu 4 (TLR4) kao jednog od središnjih regulatora urođenog imunskog odgovora, kao i koncentracija sIgA u crijevima. Brojni literaturni navodi upućuju na to da tanini i njihovi razgradni produkti mogu značajno modulirati upalne procese i imunski odgovor (ROMIER i sur., 2009.; SHAKOOR i sur., 2021.). Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na izražen protuupalni i imunomodulatorni potencijal tanina, što se očitovalo smanjenjem ekspresije ključnih proupalnih citokina IL-6 i TNF- α , kao i smanjenjem ekspresije TLR4. Smanjena aktivacija TLR4 upućuje na oslabljenu stimulaciju signalnih putova povezanih s urođenim imunskim odgovorom, čime se vjerojatno smanjuje intenzitet upalne reakcije u crijevima. Takva modulacija upalnog i imunskog odgovora ima važnu fiziološku implikaciju budući da pridonosi održavanju ravnoteže između nužne imunске aktivacije i njezine regulacije, čime se sprječava razvoj pretjerane ili kronične upale crijevne sluznice. U tom kontekstu, dobiveni rezultati podupiru hipotezu da tanini mogu djelovati kao regulatorni čimbenici crijevne homeostaze, osobito u uvjetima intenzivnog tova. Navedeni nalazi u skladu su s prethodnim istraživanjima primjene tanina u hranidbi peradi, u kojima je također zabilježen povoljan učinak na upalne i imunске parametre, uključujući smanjenje ekspresije proupalnih citokina i modulaciju imunskog odgovora (NIU i sur., 2020.; LIU i sur., 2023.). Utjecaj tanina na imunski sustav uvelike ovisi o primijenjenoj dozi. Dok su niske koncentracije tanina u obroku, oko 0,5 g/kg hrane, povezane s povoljnim imunomodulatornim učinkom, primjena visokih doza, primjerice 30 g/kg, ne pokazuje takav učinak ili može čak rezultirati negativnim posljedicama za imunski odgovor (RAMAH i sur., 2020.). U tom kontekstu,

doza tanina primijenjena u ovom istraživanju (0,75 g/kg hrane) nalazila se u rasponu niskih, biološki učinkovitih koncentracija opisanih u literaturi, zbog čega je bilo opravdano očekivati povoljan učinak na upalne i imunosne parametre. Dobiveni rezultati potvrdili su takvo očekivanje, ukazujući na izražen protuupalni i imunomodulatorni učinak tanina, bez negativnih posljedica na imunosni odgovor. Zanimljivo je da, osim doze, na učinak tanina na upalne i imunološke parametre značajan utjecaj ima i njihov izvor. Tako je izraženiji imunološki odgovor zabilježen kada se tanini primjenjuju u kompleksu s proteinskim izolatom soje (STARČEVIĆ i sur., 2025.), kao i ovisno o biljnoj vrsti iz koje su tanini izolirani, neovisno o tome radi li se o HT-u ili KT-u (LIU i sur., 2023.). Ovi nalazi upućuju na to da kemijska struktura tanina, kao i struktura njihovih vezanih ili razgradnih produkata, ima važnu ulogu u modulaciji imunosnog odgovora. Tanini mogu utjecati i na koncentraciju IgA u serumu pilića te na razinu sIgA u crijevima (LIU i sur., 2023.). U ovom istraživanju koncentracija sIgA bila je značajno viša u obje pokusne skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom, a dodatno je utvrđena i značajno viša koncentracija sIgA kod primjene KT-a u odnosu na HT. Ovaj nalaz od velike je važnosti jer sIgA predstavlja prvu liniju obrane sluznice crijeva te ima ključnu ulogu u očuvanju integriteta crijevne barijere (CORNIC i sur., 2015.). Utjecaj tanina na mukoznu imunost vjerojatno je barem djelomično povezan s njihovim antioksidativnim svojstvima, što je u skladu s nalazima ranijih istraživanja (SUN i sur., 2015.). Međutim, mehanizmi kojima različite vrste tanina moduliraju razinu sekretornog IgA još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Iako su u ovom istraživanju KT rezultirali izraženijim povećanjem koncentracije sIgA u odnosu na HT, takav se učinak ne može jednoznačno pripisati samoj podjeli tanina na HT i KT. Naime, istraživanja u kojima je uspoređivan veći broj pripravaka različitog biljnog podrijetla upućuju na to da je učinak tanina na razinu sIgA u većoj mjeri određen njihovim izvorom, odnosno biljnom vrstom, nego njihovom kemijskom klasifikacijom (LIU i sur., 2023.). Autori takve razlike objašnjavaju varijabilnim i često izraženijim antioksidativnim svojstvima tanina iz pojedinih biljnih izvora, što može rezultirati različitim stupnjem stimulacije mukozne imunosti. Stoga dobivene razlike između KT-a i HT-a u ovom istraživanju treba tumačiti s oprezom, uzimajući u obzir da one mogu odražavati specifična svojstva korištenih pripravaka, a ne isključivo razlike između dviju skupina tanina.

Nadalje, tanini se ističu izraženim antimikrobnim potencijalom, pri čemu intenzitet i spektar njihova djelovanja uvelike ovise o podrijetlu i kemijskoj strukturi pojedinih spojeva (DONG i sur., 2018.). Unatoč velikom broju istraživanja, mehanizam antimikrobnog djelovanja

tanina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, već se opisuje kao višeslojan proces koji uključuje istodobno djelovanje na više staničnih ciljeva (SIKKEMA i sur., 1995.). Dosadašnje spoznaje upućuju na to da je temelj tog učinka njihova interakcija s površinom bakterijske stanice, pri čemu dolazi do destabilizacije stanične membrane, promjena u njezinoj propusnosti te inhibicije ključnih metaboličkih procesa, što u konačnici rezultira smanjenjem rasta ili eliminacijom bakterija (BOUARAB-CHIBANE i sur., 2019.). U tom kontekstu, rezultati ovog istraživanja jasno potvrđuju antimikrobni potencijal tanina budući da je pri primjeni obje vrste tanina zabilježeno značajno smanjenje broja *E. coli* u fecesu. Takav nalaz u skladu je s većinom dosad objavljenih istraživanja (DANESHMAND KHORASGANI i sur., 2025.; STARČEVIĆ i sur., 2025.) te upućuje na to da, unatoč razlikama u kemijskoj strukturi i mehanizmima djelovanja, i HT i KT mogu učinkovito djelovati protiv *E. coli* u uvjetima intenzivnog tova pilića. Dodatnu potvrdu ovih rezultata pružaju istraživanja koja su ispitivala antimikrobnu aktivnost tanina prema sojevima *E. coli* izoliranim iz peradi, uključujući avijarni patogeni soj (APEC), pri čemu je dokazana izražena aktivnost i HT-a podrijetlom iz kestena te KT-a iz quebracha (ĆILERDŽIĆ i sur., 2024.). Ovakvi nalazi upućuju na to da se antimikrobni učinak tanina ne može pripisati isključivo jednoj skupini, već da obje vrste, unatoč strukturnim razlikama, mogu značajno doprinijeti smanjenju patogenog opterećenja u crijevima peradi. Slijedom navedenog, tanini se nameću kao funkcionalni dodatak hrani s potencijalno važnom ulogom u strategijama kontrole crijevne mikrobiote, smanjenja prisutnosti patogenih bakterija te posljedično očuvanja zdravlja i proizvodne učinkovitosti peradi.

Osim izravnog antimikrobnog djelovanja, tanini mogu ostvariti antimikrobni učinak i neizravno, putem povećanja koncentracije nižih masnih kiselina (NMK) u probavnom sustavu. Koncentracija NMK-a kod pilića mijenja se tijekom rasta i razvoja, pri čemu se octena kiselina pojavljuje već trećeg dana života, dok se propionska i maslačna kiselina javljaju između 12. i 15. dana, nakon čega se koncentracije svih triju NMK-a stabiliziraju (VAN DER WIELEN i sur., 2000.). Tijekom tog razdoblja pilići postupno razvijaju prirodnu otpornost prema određenim patogenim bakterijama, što se dovodi u vezu s postizanjem dovoljne koncentracije NMK-a i posljedičnim sniženjem pH vrijednosti u crijevima, čime se ograničava rast nepoželjnih bakterija, osobito iz porodice *Enterobacteriaceae*, nakon drugog tjedna života (BARNES i sur., 1979.). Prethodna istraživanja pokazala su da taninska kiselina može utjecati na fermentacijske procese u probavnom sustavu peradi i povisiti koncentraciju NMK-a (MAŠEK i sur., 2014.; STARČEVIĆ i sur., 2025.), a sličan je učinak zabilježen i kod drugih monogastričnih životinja (BARSZCZ i sur.,

2011.). U tom kontekstu, smanjenje broja *E. coli* u fecesu pilića zabilježeno u ovom istraživanju može se tumačiti kao rezultat kombiniranog djelovanja tanina, koje uključuje izravan antimikrobni učinak te neizravan učinak posredovan promjenama u crijevnoj fermentaciji i povećanjem koncentracije NMK-a u probavnom sustavu tovnih pilića. U ovom istraživanju nije utvrđena značajna razlika u učinku HT-a i KT-a na broj fekalne *E. coli*. Ipak, valja istaknuti da literatura upućuje na postojanje razlika u antimikrobnom djelovanju tanina ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi. Tako je zabilježeno da je antimikrobni učinak tanina kestena izraženiji kada se primjenjuju u kompleksu s proteinima soje u usporedbi s primjenom samog tanina kestena (STARČEVIĆ i sur., 2025.), što dodatno naglašava složenost i višedimenzionalnost mehanizama djelovanja tanina.

Rezultati ovog istraživanja ukazali su na pozitivan učinak oba tipa tanina i na crijevnu morfometriju. U jejunumu je zabilježeno povećanje duljine i površine crijevnih resica, što upućuje na povećan kapacitet resorpcije hranjivih tvari, u skladu s prethodnim istraživanjima (BUYSE i sur., 2021.). Takve promjene u crijevnoj morfologiji sugeriraju da tanini mogu imati važnu ulogu u očuvanju integriteta crijevne sluznice te posljedično u poboljšanju probavljivosti i učinkovitosti resorpcije hranjivih tvari (LIU i sur., 2023.). Također, poticajni učinci tanina na crijevnu morfometriju često se dovode u vezu s njihovim antioksidativnim svojstvima, koja doprinose zaštiti epitelne membrane od oksidativnog stresa izazvanog intenzivnim metabolizmom karakterističnim za toвне piliće (LIU i sur., 2021.). Osim toga, tanini mogu inhibirati djelovanje određenih bakterijskih enzima koji narušavaju integritet intestinalne barijere, čime dodatno pridonose očuvanju funkcionalnosti crijevne sluznice (LIU i sur., 2023.). Očuvanje crijevne barijere ključno je za prevenciju upalnih procesa i optimizaciju resorpcije hranjivih tvari, što se u ovom istraživanju očitovalo povećanom duljinom crijevnih resica i većim brojem enterocita u skupinama peradi hranjene taninima. Slični rezultati zabilježeni su i u istraživanjima provedenima na drugim životinjskim vrstama, u kojima je dodatak tanina doveo do poboljšanja crijevne morfometrije, uključujući povećanje visine i površine resica te broja enterocita, što dodatno potvrđuje njihov povoljan učinak na zdravlje crijeva i učinkovitost resorpcije hranjivih tvari (BILIĆ-ŠOBOT i sur., 2016.; WANG i sur., 2020.; YIN i sur., 2020.). Unatoč pozitivnim promjenama u crijevnoj morfometriji, potrebno je naglasiti da se dobiveni učinci ne mogu jednoznačno pripisati jednom mehanizmu djelovanja tanina, već su vjerojatno rezultat njihove višestruke aktivnosti, uključujući antioksidativno, antimikrobno i imunomodulatorno djelovanje. Također, s obzirom na varijabilnost

rezultata među različitim vrstama tanina i njihovim biljnim izvorima, opravdano je zaključiti da povoljni učinci na crijevnu strukturu ovise o specifičnim svojstvima primijenjenih pripravaka. Stoga su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razjasnila relativna važnost pojedinih mehanizama te utvrdili uvjeti pod kojima tanini ostvaruju maksimalan učinak na zdravlje i funkcionalnost crijeva.

Pri tumačenju dobivenih rezultata potrebno je uzeti u obzir određena ograničenja ovog istraživanja. Prije svega, ispitivanje je provedeno primjenom samo jedne razine dodatka tanina (0,75 g/kg hrane), što ne omogućuje procjenu doznog odgovora. Nadalje, korištena su dva izvora tanina, koji predstavljaju HT i KT, što ograničava mogućnost generalizacije dobivenih učinaka na sve izvore HT-a i KT-a, osobito imajući u vidu značajnu varijabilnost u njihovu kemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti ovisno o biljnom podrijetlu. Također, iako su u istraživanju obuhvaćeni brojni funkcionalni pokazatelji, uključujući oksidativni status, sastav masnih kiselina, crijevnu mikrobiotu, imunosni odgovor i morfometriju crijeva, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi uočenih promjena nisu izravno ispitivani. Izostanak analize signalnih putova povezanih s regulacijom upale, oksidativnog stresa i metabolizma lipida ograničava mogućnost potpunog mehanističkog objašnjenja dobivenih rezultata. Dodatno, istraživanje je provedeno u uvjetima standardnog intenzivnog tova tijekom jednog proizvodnog ciklusa, pa se rezultati odnose na specifičan fiziološki i proizvodni kontekst, što zahtijeva oprez pri njihovoj primjeni u drugačijim hranidbenim, okolišnim ili proizvodnim uvjetima.

Unatoč navedenim ograničenjima, rezultati ovog istraživanja pružaju čvrstu znanstvenu osnovu za diferenciranu primjenu tanina u hranidbi tovne peradi te jasno potvrđuju da se tanini ne mogu promatrati kao homogena skupina dodataka s jedinstvenim učinkom. Njihovo djelovanje proizlazi iz složene interakcije doze, kemijske strukture, izvora tanina i biološkog konteksta primjene, uključujući fiziološki status životinja. Uočeni učinci na oksidativni status, crijevnu mikrobiotu, imunosni odgovor i morfologiju crijeva upućuju na to da pravilno odabrani i primijenjeni tanini mogu pridonijeti očuvanju funkcionalne stabilnosti probavnog sustava, metaboličke ravnoteže organizma i integriteta crijevne sluznice, čime se stvaraju preduvjeti ne samo za optimalnu proizvodnost, već i za bolje zdravlje i cjelokupnu dobrobit tovnih pilića. Istodobno, jasno izražene razlike između HT-a i KT-a dodatno naglašavaju složenost njihovih mehanizama djelovanja te potrebu za daljnjim istraživanjima usmjerenim na razjašnjavanje molekularnih i fizioloških osnova njihova djelovanja te preciznije definiranje optimalnih uvjeta

njihove primjene u suvremenim strategijama hranidbe peradi. U tom smislu, tanini se nameću kao obećavajući, ali zahtjevni funkcionalni dodaci hrani, čija se učinkovitost temelji na pažljivom odabiru vrste i doze, uz nužno uvažavanje specifičnih proizvodnih i bioloških okolnosti.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja, koje je obuhvatilo usporedbu učinaka kondenziranih (quebracho) i hidrolizirajućih (kesten) tanina u dozi od 0,75 g/kg u hranidbi pilića u tovu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Hidrolizirajući tanini poboljšavaju proizvodne rezultate pilića u tovu (završnu masu i prirast), dok ovaj učinak izostaje kod kondenziranih tanina.
2. Dodavanje hidrolizirajućih i kondenziranih tanina povezano je sa smanjenjem pojavnosti kontaktnih dermatitisa, čime značajno poboljšavaju opće zdravstveno stanje životinja, kao i tržišnu prihvatljivost.
3. Primjena obje vrste tanina dovodi do smanjenja koncentracije amonijaka u biozoni životinja, čime je potvrđen pozitivan učinak ovih pripravaka na dobrobit životinja i zdravlje dišnog sustava.
4. Primjena hidrolizirajućih i kondenziranih tanina značajno poboljšava antioksidativnu obranu kod tovnih pilića.
5. Obje vrste tanina pokazale su protuupalni i imunomodulatorni potencijal te smanjile broj *E. coli* u fecesu, što upućuje na njihovu moguću ulogu u očuvanju zdravlja probavnog sustava kod pilića u tovu.
6. Obje vrste tanina povoljno su utjecale na crijevnu morfometriju, što upućuje na mogućnost povećanja resorpcijske površine i očuvanja funkcionalnog integriteta crijevne sluznice te se time može objasniti pozitivan učinak na proizvodne rezultate.
7. Uočeni pozitivni učinci obje vrste tanina samo se djelomično preklapaju, što potvrđuje našu hipotezu o različitim mehanizmima djelovanja ovisno o vrsti. Stoga dobiveni rezultati otvaraju prostor za daljnja istraživanja optimizacije primjene tanina u hranidbi pilića u tovu, osobito u kontekstu mogućeg sinergističkog djelovanja različitih vrsta tanina.

8. POPIS LITERATURE

ABOAGYE, I. A., K. A. BEAUCHEMIN (2019): Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: A review. *Anim.* 9, 856.

DOI:10.3390/ani9110856

AHMED, S. T., C. J. YANG (2017): Effects of dietary *Punica granatum* L. by-products on performance, immunity, intestinal and fecal microbiology, and odorous gas emissions from excreta in broilers. *J. Poult. Sci.* 54, 157–166.

DOI:10.2141/jpsa.0160116

AL-HIJAZEEN, M., E. J. LEE, A. MENDONCA, D. U. AHN (2016): Effects of tannic acid on lipid and protein oxidation, color, and volatiles of raw and cooked chicken breast meat during storage. *Antioxidants* 5.

DOI: 10.3390/antiox5020019

ALI, M., H. A. MEHBOOB, M. A. MIRZA, H. RAZA, M. OSREDKAR (2017): Effect of hydrolysable tannin supplementation on production performance of dairy crossbred cows. *J. Anim. Plant Sci.* 27, 1088-1093.

APAK, R., M. ÖZYÜREK, K. GÜÇLÜ, E. ÇAPANOĞLU (2016): Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 997–1027.

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04739

BARNES, E. M., C. S. IMPEY, B. J. STEVENS (1979): Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick. *J. Hyg.* 82, 263-83.

BARSZCZ, M., M. TACIAK, J. SKOMIAŁ (2011): A dose-response effects of tannic acid and protein on growth performance, caecal fermentation, colon morphology, and β -glucuronidase activity of rats. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 613-625.

DOI:10.22358/jafs/66219/2011

BATTELLI, M., S. COLOMBINI, G. M. CROVETTO, G. GALASSI, F. ABENI, F. PETRERA, M. T. MANFREDI, L. RAPETTI (2024): Condensed tannins fed to dairy goats: Effects on digestibility, milk production, blood parameters, methane emission, and energy and nitrogen balances. *J. Dairy Sci.* 107, 3614-3630.

DOI:10.3168/JDS.2023-24076

BENZIE, I. F. F., J. J. STRAIN (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.

DOI: 10.1006/abio.1996.0292

BIAGI, G., I. CIPOLLINI, B. R. PAULICKS, F. X. ROTH (2010): Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 64, 121–135.

DOI:10.1080/17450390903461584

BILIĆ-ŠOBOT, D., V. KUBALE, M. ŠKRLEP, M. ČANDEK-POTOKAR, M. PREVOLNIK POVŠE, G. FAZARINC, D. ŠKORJANC (2016): Effect of hydrolysable tannins on intestinal morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 70, 178-388.

DOI: 0.1080/1745039X.2016.1206735

BODOIRA, R., D. MAESTRI (2020): Phenolic compounds from nuts: Extraction, chemical profiles, and bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* 68, 927–942.

DOI: 10.1021/acs.jafc.9b07160

BOSTAMI, A. B. M. R., S. T. AHMED, M. M. ISLAM, H. S. MUN, S. Y. KO, S. S. KIM, C. J. YANG (2015): Growth performance, fecal noxious gas emission and economic efficacy in broilers fed fermented pomegranate byproducts as residue of fruit industry. *Int. J. Adv. Res.* 3, 102–114.

BOUARAB-CHIBANE, L., V. FORQUET, P. LANTÉRI, Y. CLÉMENT, L. LÉONARD-AKKARI, N. OULAHAL, P. DEGRAEVE, C. BORDES (2019): Antibacterial properties of

polyphenols: characterization and QASR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Front. Microbiol.* 10, 829.

DOI:10.3389/fmicb.2019.00829

BOURCKHARDT, L. E. H., M. S. MARCHIORI, B. KLEIN B, A. COMIN, C. MARCHIORO, J. L. F. DE LIMA, D. D. BRUTTI, A. S. DA SILVA (2025a): Condensed tannins in drinking water for broilers and their effects on intestinal micrometry, performance, and fatty acid profile in meat. *Vet. Sci.* 12.

DOI:10.3390/vetsci12121125

BOURCKHARDT, L. E. H., M. SULZBACH MARCHIORI, B. KLEIN, A. COMIN, C. MARCHIORO, J. L. FARIAS DE LIMA, D. D. BRUTTI, A. SCHAFFER DA SILVA (2025b): Condensed tannins in drinking water for broilers and their effects on intestinal health and meat quality. *Vet. Sci.* 12, 1125.

DOI:10.3390/vetsci12121125

BRAND-WILLIAMS W, M. E. CUVELIER, C. BERSET (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25-30.

DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

BRENES, A., A. VIVEROS, I. GOÑI, C. CENTENO, S. G. SÁYAGO-AYERDY, I. ARIJA, F. SAURA-CALIXTO (2008): Effect of grape pomace concentrate and vitamin e on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poult. Sci.* 87, 307-316.

DOI:10.3382/ps.2007-00297

BRUNETTO, A. L R., A. L F. DOS SANTOS, I. ZAGO, G. L. DEOLINO, L. NORA, V. L. MOLOSSE, R. V. P. LAGO, A. C. MACHADO, R. WAGNER, J. N. NAUDERER, B. F. BISSACOTTI, A. P. KEMPKA, B. KLEIN, A. S. DA SILVA (2024): Intake of condensed tannins (*Acacia mearnsii*) by lambs in confinement and its impact on growth performance, rumen environment, and meat. *Fermentation* 10.

DOI:10.3390/fermentation10120630

BRUS, M., R. FRANGEŽ, M. GORENJAK, P. KOTNIK, Ž. KNEZ, D. ŠKORJANC (2021): Effect of hydrolyzable tannins on glucose-transporter expression and their bioavailability in pig small-intestinal 3D cell model. *Molecule* 26.

DOI:10.3390/molecules26020345

BUTLER, L., D. J. RIEDL, D. LEBRYK, H. BLYTT (1984): Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 916-920.

DOI:10.1007/BF02542166

BUYSE, K., E. DELEZIE, L. GOETHALS, N. VAN NOTEN, R. DUCATELLE, G. P. J. JANSSENS, M. LOURENCO (2021): Chestnut tannins in broiler diets: Performance, nutrient digestibility, and meat quality. *Poult. Sci.* 100, 101479.

DOI: 10.1016/j.psj.2021.101479

CASTILLO, A. R., J. A. DI RIENZO, D. CAVALLINI (2025): Effect of a mix of condense and hydrolysable tannins feed additive on lactating dairy cows' services per conception and days open. *Vet. Anim. Sci.* 27.

DOI: 10.1016/j.vas.2025.100434

CENGIZ, Ö., B. H. KÖKSAL, O. TATLI, Ö. SEVİM, U. AHSAN, S. F. BILGILI, A. G. ÖNOL (2017): Effect of dietary tannic acid supplementation in corn- or barley-based diets on growth performance, intestinal viscosity, litter quality, and incidence and severity of footpad dermatitis in broiler chickens. *Livest. Sci.* 202, 52-57.

DOI: 10.1016/j.livsci.2017.05.016

CHAMORRO, S., A. VIVEROS, A. REBOLÉ, B. D. RICA, I. ARIJA, A. BRENES (2015): Influence of dietary enzyme addition on polyphenol utilization and meat lipid oxidation of chicks fed grape pomace. *Food Res. Int.* 73, 197-203.

DOI: 10.1016/j.foodres.2014.11.054

CHOI, J., W. K. KIM (2020): Dietary application of tannins as a potential mitigation strategy for current challenges in poultry production: A review. *Anim.* 10, 2389.

DOI:10.3390/ani10122389

CHOI, J., Y. H. TOMPKINS, P.-Y. TENG, R. M. GOGAL, W. K. KIM (2022): Effects of tannic acid supplementation on growth performance, oocyst shedding, and gut health of broilers infected with *Eimeria maxima*. *Anim.* 12, 1378.

DOI:10.3390/ani12111378

ĆILERDŽIĆ, M., A. RADALJ, M. ILIĆ, I. PROŠIĆ, M. ŠEKLER, R. RESANOVIĆ, V. KRSTIĆ, N. ZDRAVKOVIĆ, S. STANOJEVIĆ, D. KRNJAIĆ D. (2024): The in vitro antimicrobial effects of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Escherichia coli* isolated from pathological samples of deceased poultry. *Acta Vet. Beogr.* 74, 409-429.

DOI: 10.2478/acve-2024-0028

CORNICK, S., A. TAWIAH, K. CHADEE (2015): Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3, e982426.

DOI:10.4161/21688370.2014.982426

CORTHÉSY, B. (2013): Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 4, 185.

DOI: 10.3389/fimmu.2013.00185

COSME, F., A. AIRES, T. PINTO, I. OLIVEIRA, A. VILELA, B. GONÇALVES (2025): A comprehensive review of bioactive tannins in foods and beverages: functional properties, health benefits, and sensory qualities. *Mol.* 30, 5000-5801.

DOI: 10.3390/molecules30040800

DANESHMAND KHORASGANI, H., A. H. MAHDAVI, M. SEDGHI, M. SHAHSAVAN (2025): Effect of hydrolyzable tannin and organic acids on productive performance, ileal microbiota and histomorphology, and immunocompetence indices of broiler chicken. *Sci. Rep.* 5, 38696.

DOI:10.1038/s41598-025-22436-x

DÍAZ CARRASCO J. M., E. A. REDONDO, N. D. PIN VISO, L. M. REDONDO, M. D. FARBER, M. E. FERNÁNDEZ MIYAKAWA (2018): Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. *Biomed. Res. Int.* 1879168.

DOI:10.1155/2018/1879168

DIAZ CARRASCO, J. M., E. A. REDONDO, N. D. PIN VISO, L. M. REDONDO, M. D. FARBER, M. E. FERNANDEZ MIYAKAWA (2018): Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. *Biomed. Res. Int.* 21, 1879168.

DOI:10.1155/2018/1879168

DONG, G., H. LIU, X. YU, X. ZHANG, H. LU, T. ZHOU, J. CAO (2018): Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Nat. Prod. Res.* 32, 2225-2228.

DOI: 10.1080/14786419.2017.1366485

EBRAHIM, R., J. B. LIANG, M. F. JAHROMI, P. SHOKRYZDAN, M. EBRAHIMI, W. L. CHEN, Y. M. GOH (2015): Effects of tannic acid on performance and fatty acid composition of breast muscle in broiler chickens under heat stress. *Ital. J. Anim. Sci.* 14.

DOI:10.4081/ijas.2015.3956

EŞKI, HT., N. GÜLŞE (2025): Effects of quebracho condensed tannin on growth performance, digestibility, health parameters and mortality in chukar partridge chicks. *J. Cent. Eur. Agric.* 26, 63–75.

DOI:10.5513/JCEA01/26.1.4534

FRAGA, C. G., M. GALLEANO, S. V. VERSTRAETEN, P. I. OTEIZA (2010): Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 31, 435–445.

DOI: 10.1016/j.mam.2010.09.006

FRAGA-CORRAL, M., P. GARCÍA-OLIVEIRA, A. G. PEREIRA, C. LOURENÇO-LOPES, C. JIMENEZ-LOPEZ, M. A. PRIETO, J. SIMAL-GANDARA (2020): Technological application of tannin-based extracts. *Mol.* 25, 614.

DOI:10.3390/molecules25030614.

FREEMAN, N., F. A. M. TUYTTENS, A. JOHNSON, V. MARSHALL, A. GARMYN, L. JACOBS (2020): Remediating contact dermatitis in broiler chickens with novel flooring treatments. *Anim.* 10, 1761.

DOI: 10.3390/ani10101761

GERLACH, K., M. PRIES, E. THOLEN, A. J. SCHMITHAUSEN, W. BÜSCHER, K.-H. SÜDEKUM (2018): Effect of condensed tannins in rations of lactating dairy cows on production variables and nitrogen use efficiency. *Anim.* 12, 1847–1855.

DOI:10.1017/S1751731117003639

GIRARD, M., S. THANNER, N. PRADERVAND, D. HU, C. OLLAGNIER, G. BEE (2018): Hydrolysable chestnut tannins for reduction of postweaning diarrhea: Efficacy on an experimental ETEC F4 model. *Plos One*.

DOI: 10.1371/journal.pone.0197878

HAGERMAN, A. E., K. M. REILD, G. A. JONES, K. N. SOVIK, N. T. RITCHARD, P. W. HARTZFELD, T. L. RICHEL (1998): High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1887–1892.

DOI:10.1021/jf970975b

HASLAM, E. (1996): Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59, 205–215.

DOI:10.1021/np960040+

HASLAM, E. (1998): Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo.

HASSANPOUR, S., N. MAHERI-SIS, B. ESHRATKHAH, F. BAGHBANI MEHMANDAR (2011): Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int. J. Forest, Soil and Erosion* 1, 47-53.

HE, H.-F. (2022): Recognition of Gallotannins and the physiological activities: From chemical view. *Front. Nutr.* 9.

DOI: 10.3389/fnut.2022.888892

HIDAYAT, C., A. IRAWAN, A. JAYANEGARA, A. M. M. SHOLIKIN, T. R. PRIHAMBODO, Y. R. YANCA, E. WINA, S. SADARMAN, R. KRISNAN, I. ISBANDI (2021): Effect of dietary tannins on the performance, lymphoid organ weight, and amino acid ileal digestibility of broiler chickens: A meta-analysis. *Vet. World* 14, 1405–1411.

DOI:10.14202/vetworld.2021.1405-1411

HOSTE H, G. MEZA-OCAMPOS, S. MARCHAND, S. SOTIRAKI, K. SARASTI, B. M. BLOMSTRAND, A. R. WILLIAMS, S. M. THAMSBORG, S. ATHANASIADOU, H. L. ENEMARK, J. F. TORRES ACOSTA, G. MANCILLA-MONTELONGO, C. S. CASTRO, L. M. COSTA-JUNIOR, H. LOUVANDINI, D. M. SOUSA, J. P. SALMINEN, M. KARONEN, M. ENGSTROM, J. CHARLIER, V. NIDERKORN, E. R. MORGAN (2022): Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Parasit.* 29.

DOI:10.1051/parasite/2022010

HUANG, Q., X. LIU, G. ZHAO, T. HU, Y. WANG (2018): Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Anim. Nutr.* 4, 137-150.

DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.004

IMPERATORE, R., B. FRONTE, D. SCICCHITANO, G. ORSO, M. MARCHESE, S. MERO, R. LICITRA, E. COCCIA, M. CANDELA, M. PAOLUCCI (2022): dietary supplementation with a

blend of hydrolyzable and condensed tannins ameliorates diet-induced intestinal inflammation in zebrafish (*Danio rerio*). *Anim.* 13, 167.

DOI: 10.3390/ani13010167.

KHAJALI, F. F. RAFIEI (2024): A review of plant anti-nutritional factors in animal health and production: The classification, biological properties, and the passivation strategy. *J. Agric. Food Res.* 18, 101290.

DOI: 10.1016/j.jafr.2024.101290

KHANBABAEE, K., VAN REE, T. (2001): Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641–649.

DOI: 10.1039/B101061L

LEE S., P. SHINDE, J. CHOI, I. KWON, J. LEE, S. PAK, W. CHO, B. CHAE (2010): Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs. *Livest. Sci.* 131, 281-286.

DOI: 10.1016/J.LIVSCI.2010.04.013

LI, M., J. LIN, W-D. WU, P. LIU, Y. JIANG, J. KUANG, S-Y. TANG, L. ZHOU, X-Q. ZHOU (2020): Condensed tannins decreased the growth performance and impaired intestinal immune function in on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Br. J. Nutr.* 123, 737-755.

DOI: 10.1017/S0007114519003295

LI, Y., S. BAOSHUN (2025): Exploring the role of health consciousness and environmental awareness in purchase intentions for green-packaged organic foods: an extended TPB model. *Front. Nutr.* 21.

DOI: 10.3389/fnut.2025.1528016

LIU, H. S., S. U. MAHFUZ, D. WU, Q. H. SHANG, X. S. PIAO (2020): Effect of chestnut wood extract on performance, meat quality, antioxidant status, immune function, and cholesterol metabolism in broilers. *Poult. Sci.* 99, 4488–4495.

DOI: 10.1016/j.psj.2020.05.053

LIU, Q. X., Y. ZHOU, X. M. LI, D. D. MA, S. XING, J. H. FENG, M. H. ZHANG (2020): Ammonia induce lung tissue injury in broilers by activating NLRP3 inflammasome via Escherichia/Shigella. *Poult. Sci.* 99, 3402-3410.

DOI: 10.1016/j.psj.2020.03.019

LIU, S., K. WANG, S. LIN, Z. ZHANG, M. CHENG, S. HU, H. HU, J. XIANG, F. CHEN, G. LI, H. SI (2023). Comparison of the Effects between Tannins Extracted from Different Natural Plants on Growth Performance, Antioxidant Capacity, Immunity, and Intestinal Flora of Broiler Chickens. *Antioxidants* 2, 441.

DOI: 10.3390/antiox12020441

LOHMANN BREEDERS (2025): Digestion involves a combination of mechanical, chemical, and microbiological processes. Lohmann Breeders GMBH, Cuxhaven, Germany. <https://lohmann-breeders.com/digestive-system-of-laying-hens/> (7.4.2026.)

MAKKAR, H. P. S. (2003): Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49, 241-256.

DOI:10.1016/S0921-4488(03)00142-1

MARZO, F., E. URDANETA, S. SANTIDRIÁN (2002): Liver proteolytic activity in tannic acid-fed birds. *Poult. Sci.* 81, 92-4.

DOI: 10.1093/ps/81.1.92

MARZONI, M., A. CASTILLO, A. FRANZONI, J. NERY, R. FORTINA, I. ROMBOLI, A. SCHIAVONE (2020): Effects of dietary quebracho tannin on performance traits and parasite load in an Italian slow-growing chicken (White Livorno Breed). *Anim.* 10.

DOI: 10.3390/ani10040684

MAŠEK, T., STARČEVIĆ, K., MIKULEC, Ž. (2014): The influence of addition of thymol, tannic acid or gallic acid to broiler diet on growth performance, serum malondialdehyde value and cecal fermentation. *EPS* 78, 64.

DOI: 10.1399/eps.2014.64

MAYINE, R. K., R. W. ELSE, P. M. HOCKING (2007): High litter moisture alone is sufficient to cause footpadderatitis in growing turkeys. *Br. Poult. Sci.* 48, 538 — 545.

DOI: 10.1080/00071660701573045

MAYSONNAVE, G. S., D. DIAS BRUTTI, V. M. DA SILVA, C. STEFANELLO (2024): Evaluation of increasing levels of *Acacia mearnsii* tannins on growth performance and intestinal morphometrics of broiler chickens undergoing a *Salmonella Heidelberg* challenge. *Poult.* 3, 284-297.

DOI: 10.3390/poultry3030021

MEDUGU, C., B. SALEH, J. IGWEBUIKE, R. NDIRMBITA (2012): Strategies to improve the utilization of tannin-rich feed materials by poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 11, 417.

DOI: 10.3923/ijps.2012.417.423

MEHDI, Y., M. P. LÉTOURNEAU-MONTMINY, M. L. GAUCHER, Y. CHORFI, G. SURESH, T. ROUISS, S. K. BRAR, C. COTE, A. A. RAMIREZ, S. GODBOUT (2018): Use of antibiotics in broiler production: Global trends and alternatives. *Anim. Nutr.* 4, 170-178.

DOI: 10.1016/j.aninu.2018.03.002

MINIERI, S., A. BUCCIONI, A. SERRA, I. GALIGANI, A. PEZZATI, S. RAPACCINI, M. ANTONGIOVANNI (2016): Nutritional characteristics and quality of eggs from laying hens fed on a diet supplemented with chestnut tannin extract (*Castanea sativa*). *Br. Poult. Sci.* 57, 824-832.

DOI: 10.1080/00071668.2016.1216944

MOCCIA, F., A. PISCITELLI, S. GIOVANDO, P. GIARDINA, L. PANZELLA, M. D'ISCHIA, A. NAPOLITANO (2020): Hydrolyzable vs. condensed wood tannins for bio-based antioxidant coatings: Superior properties of quebracho tannins. *Antioxidants* 9.

DOI: 10.3390/antiox9090804.

MOLINO S., A. LERMA-AGUILERA, N. JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, J. A. RUFÍAN HENARES, M. P. FRANCINO (2022): Evaluation of the effects of a short supplementation with tannins on the gut microbiota of healthy subjects. *Front Microbiol.* 27, 848611.

DOI:10.3389/fmicb.2022.848611

MUELLER-HARVEY, I. (2006): Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010–2037.

DOI:10.1002/jsfa.2577

NECHITAILO, K. S., E. A. SIZOVA, S. V. LEBEDEV, K. V. RYAZANTSEVA (2024): Causes, mechanisms of development and manifestations of antibiotic resistance in poultry farming, consequences and methods of overcoming (review). *World's Poult. Sci. J.* 80, 453-479.

DOI: 10.1080/00439339.2024.2315461

NIU J., Q. WANG, C. JING, Y. LIU, H. LIU, N. JIAO, L. HUANG, S. JIANG, Q. GUAN, Y. LI, W. YANG (2022): Dietary *Galla Chinensis* tannic acid supplementation in the diets improves growth performance, immune function and liver health status of broiler chicken. *Front. Vet. Sci.* 9, 1024430.

DOI: 10.3389/fvets.2022.1024430.

NUAMAH, E., J. I. C. POATY DITENGOU, F. HIRWA, I. CHEON, B. CHAE, N. J. CHOI (2024): Dietary Supplementation of Tannins: Effect on Growth Performance, Serum Antioxidant Capacity, and Immunoglobins of Weaned Piglets-A Systematic Review with Meta-Analysis. *Antioxidants* 13.

DOI: 10.3390/antiox13020236

OAKLEY, B. B., H. S. LILLEHOJ, M. H. KOGUT, W. K. KIM, J. J. MAURER, A. PEDROSO, M. D. LEE, S. R. COLLETT, T. J. JOHNSON, N. A. COX (2014): The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360, 100-112.

DOI: 10.1111/1574-6968.12608.

OKUDA, T., H. ITO (2011): Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Mol.* 16, 2191-2217.

DOI:10.3390/molecules16032191

PANZELLA, L., A. NAPOLITANO (2017): Natural phenol polymers: Recent advances in food and health applications. *Antioxidants* 6.

DOI: 10.3390/antiox6020030

PRIOR, R. L., X. WU, K. SCHAICH (2005): Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.

DOI: 10.1021/jf0502698

RAMAH, A., M. YASUDA, Y. OHASHI, M. URAKAWA, T. KIDA, T. YANAGITA, R. UEMURA, H. H. BAKRY, N. M. ABDELALEEM, E. A. EL-SHEWY (2020): Different doses of tannin reflect a double-edged impact on broiler chicken immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 220, 109991.

DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.109991

RAYA-MORQUECHO, E., M., P. AGUILAR-ZARATE, L. SEPÚLVEDA, M. R. MICHEL, A. ILINÁ, C., N. AGUILAR, J. A. ASCACIO- VALDÉS (2025): Ellagitannins and their derivatives: a review on the metabolization, absorption, and some benefits related to intestinal health. *Microbiol. Res.* 16.

DOI: 10.3390/microbiolres16060113

REDONDO, E. A., L. M. REDONDO, O. A. BRUZZONE, J. M. DIAZ-CARRASCO, C. CABRAL, V. M. GARCES, M. M. LINEIRO, M. M. FERNANDEZ-MIYAKAWA (2022): Effects of a blend of chestnut and quebracho tannins on gut health and performance of broiler chickens. PLoS ONE 17, e0254679.

DOI: 10.1371/journal.pone.0254679

REZAR, V., J. SALOBIR (2014): Effects of tannin-rich sweet chestnut (*Castanea sativa*) wood extract supplementation on nutrient utilisation and excreta dry matter content in broiler chickens. Eur. Poult. Sci. 78, 1-10.

DOI: 10.1399/eps.2014.42

RICE-EVANS, C., N. MILLER, G. PAGANGA (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 2, 152-9.

DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2

ROMIER, B., Y.-J. SCHNEIDER, Y. LARONDELLE, A. DURING (2009): Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. Nutr. Rev. 67, 363-378.

DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00210.x

RUDRAPAL, M., S. J. KHAIRNAR, J. KHAN J., A. B. DUKHYIL, M. A. ANSARI, M. N. ALOMARY, F. M. ALSHABRMI, S. PALAI, P. K. DEB, R. DEVI (2022): Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. Front. Pharmacol. 13, 806470.

DOI: 10.3389/fphar.2022.806470

SANTOS-FILHO, J. M., S. M. MORAIS, D. RONDINA, F. J. BESERRA, J. N. M. NEIVA, E. F. MAGALHÃES (2005): Effect of cashew nut supplemented diet, castration, and time of storage on fatty acid composition and cholesterol content of goat meat. Small Rumin. Res. 57, 51-6.

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.06.016

SCALBERT, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30, 3875–3883.

DOI:10.1016/0031-9422(91)83426-L

SEONI, E., G. BATTACONE, S. A. KRAGTEN, F. DOHME-MEIER, G. BEE (2021): Impact of increasing levels of condensed tannins from sainfoin in the grower–finisher diets of entire male pigs on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. *Anim.* 15, 100110.

DOI: 10.1016/j.animal.2020.100110

SEPPERER, T., G. TONDI, A. PETUTSCHNIGG, T. M. YOUNG, K. STEINER (2020): Mitigation of ammonia emissions from cattle manure slurry by tannins and tannin-based polymers. *Biomol.* 10, 581.

DOI: 10.3390/biom10040581.

SERRANO, J., R. PUUPPONEN-PIMIÄ, A. DAUER, A. M. AURA, F. SAURA-CALIXTO (2009): Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 310–329.

DOI:10.1002/mnfr.200900039

SERRI, M. A., A. H. MAHDAVI, A. RIASI, F. HASHEMZADEH, R. KOWSAR (2022): The addition of hydrolyzable tannin extract to milk affects calves' performance, health, blood metabolites, and pathogen shedding. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 292.

DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2022.115451

SHAHIDI, F., P. AMBIGAIPALAN (2015): Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods*, 18, 820–897.

DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.018

SHAHIDI, F., P. AMBIGAIPALAN (2015): Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods* 18, 820-897.

DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.018

SHAKOOR, H., J. FEEHAN, V. APOSTOLOPOULOS, C. PLATAT, A. SALEM AL DHAHERI, H. I. ALI, L. C. ISMAIL, M. BOSEVSKI, L. STOJANOVSKA (2021): Immunomodulatory of Dietary Effects Polyphenols. *Nutrients* 13, 728.

DOI: 10.3390/nu13030728

SIKKEMA, J., J. A. DE BONT, B. POOLMAN (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201-22.

DOI: 10.1128/mr.59.2.201-222.1995

SMITH, A. H., R. I. MACKIE (2004): Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1104 – 1115.

DOI:10.1128/AEM.70.2.1104-1115.2004

SOUZA, D. E., K. L., CP DIAS, M. A. CALLEGARI, A. FRIDERICHS, D. E. PAES AOS, R. H. CARVALHO, C. A. DA SILVA (2025): Performance and intestinal health of piglets in the nursery phase subjected to diets with condensed black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. *Anim. Biosci.* 38, 117–130.

DOI:10.5713/ab.24.011220

STANLEY, D., R. J. HUGHES, R. J. MOORE (2014): Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4301-4310.

DOI: 10.1007/s00253-014-5646-2.

STARČEVIĆ, K., L. KRSTULOVIĆ, D. BROZIĆ, M. MAURIĆ, Z. STOJEVIĆ, Ž. MIKULEC, M. BAJIĆ, T. MAŠEK (2015): Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1172–1178.

DOI:10.1002/jsfa.6805

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEINM E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy

protein isolate complex differently influence fecal *Escherichia coli* count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. *J. Cent. Eur. Agric.* 26, 606-617. DOI: 10.5513/JCEA01/26.3.4695

SUN, Y., Z. LI, M. YAN, H. ZHAO, Z. HE, M. ZHU (2024): Responses of intestinal antioxidant capacity, morphology, barrier function, immunity, and microbial diversity to chlorogenic acid in late-peak laying hens. *Anim.* 14, 2957. DOI:10.3390/ani14202957.

SURAI, P. (2016): Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *J. Anim. Res. Nutr.* 1. DOI: 10.21767/2572-5459.100008

TAIRA, K., T. NAGAI, T. OBI, K. TAKASE (2014): Effect of litter moisture on the development of footpad dermatitis in broiler chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 583–586. DOI: 10.1292/jvms.13-0321

TANG, Q.-S., M.-F. XIAO, H.-B. YI, H.-T. XIONG, J.-Z. HUANG, E. XU (2021): Effects of dietary condensed tannins on growth performance, meat quality, immune function, antioxidant function and intestinal morphology of broilers. *Chin. J. Anim. Nutr.* 33, 3228-3236. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267x.2021.06.025

TOSI, G., P. MASSI, M. ANTONGIOVANNI, A. BUCCIONI, S. MINIERI, L. MARENCHINO, M. MELE (2013): Efficacy test of a hydrolysable tannin extract against necrotic enteritis in challenged broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* 12. DOI:10.4081/ijas. 2013.e62

TRUONG, V. L., W. S. JEONG (2021): Cellular Defensive Mechanisms of Tea Polyphenols: Structure-Activity Relationship. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9109. DOI: 10.3390/ijms22179109

VAN DER WIELEN, P. W., S. BIESTERVELD, S. NOTERMANS, H. HOFSTRA, B. A. URLINGS, F. VAN KNAPEN (2000): Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2536-2540.

DOI: 10.1128/AEM.66.6.2536-2540.2000

WANG, K., A. REN, M. ZHENG, J. JIAO, Q. YAN, C. ZHOU, Z. TAN (2020): Diet with a High Proportion of Rice Alters Profiles and Potential Function of Digesta-Associated Microbiota in the Ileum of Goats. *Animals (Basel)* 10, 1261.

DOI: 10.3390/ani10081261

WELFARE QUALITY® (2009): Welfare Quality® assessment protocol for poultry. Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.

XU, H., J. FU, Y. LUO, P. LI, B. SONG, Z. LV, Y. GUO (2023): Effects of tannic acid on the immunity and intestinal health of broiler chickens with necrotic enteritis infection. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 14, 72.

DOI: 10.1186/s40104-023-00867-8

XU, H., L. GONG, X. ZHANG, Z. LI, J. FU, Z. LV, Y. GUO (2025): Effects of tannic acid on growth performance, intestinal health, and tolerance in broiler chickens. *Poult. Sci.* 104, 104676.

DOI: 10.1016/j.psj.2024.104676

YIN, L., J. LI., H. WANG, Z. YI, L. WANG, S. ZHANG, X. LI, Q. WANG, J. LI, H. YANG, Y. YIN (2020): Effects of vitamin B6 on the growth performance, intestinal morphology, and gene expression in weaned piglets that are fed a low-protein diet¹. *J. Anim. Sci.* 98, skaa022.

DOI: 10.1093/jas/skaa022

YU, J., Y. SONG, B. YU, J. HE, P. ZHENG, X. MAO, Z. HUANG, Y. LUO, J. LUO, H. YAN, Q. WANG, H. WANG, D. CHEN (2020): Tannic acid prevents post-weaning diarrhea by improving intestinal barrier integrity and function in weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11.

DOI:10.1186/s40104-020-00496-5

ZAMARATSKAIA, G., M. K. RASMUSSEN, M. ŠKRLEP, N. BATOREK LUKAČ, D. ŠKORJANC, M. ČANDEK-POTOKAR (2016): Tissue-specific regulation of CYP3A by hydrolysable tannins in male pigs. *Xenobiotica* 46, 591–596.

DOI:10.3109/00498254.2015.1099081

ZHANG, J., X. XU, Z. CAO, Y. WANG, H. YANG, A. AZARFAR, S. LI (2019): Effect of different tannin sources on nutrient intake, digestibility, performance, nitrogen utilization, and blood parameters in dairy cows. *Anim.* 9, 507.

DOI: 10.3390/ani9080507

ŽUŽUL, S., I. SABOLEK, G. GREGURIĆ GRAČNER, J. PETRLIĆ, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2026): Effect of condensed (quebracho) and hydrolysable (sweet chestnut) tannins on growth performance and contact dermatitis in broilers. *Cro. Vet. J.* 57, 112-118.

DOI:10.46419/cvj.57.1.10

9. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA

Slavko Žužul rođen je 16. prosinca 1991. godine u Imotskom. Osnovnoškolsko obrazovanje započeo je 1998. godine u Osnovnoj školi Stjepana Radića u Imotskom, nakon čega 2006. godine upisuje opću gimnaziju u Gimnaziji dr. Mate Ujevića, u Imotskom. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja, 2010. godine upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija iskazao je akademski uspjeh te se kontinuirano nalazio među 10 % najboljih studenata u generaciji. Diplomirao je 25. travnja 2016. godine s prosjekom ocjena 4,579, stekavši ukupno 371 ECTS bod. Za postignute rezultate nagrađen je Dekanovom nagradom te "Godišnjom nagradom Genere d.d.". Već tijekom studija aktivno se uključio u nastavni i stručni rad Fakulteta; akademskih godina 2013./2014., 2014./2015. i 2015./2016. bio je demonstrator u Zavodu za higijenu, ponašanje i dobrobit životinja u okviru kolegija „Okoliš, ponašanje i dobrobit životinja“ te „Higijena i držanje životinja“. Uz nastavne obveze, bio je aktivan u radu neprofitnih studentskih udruga IVSA (*International Veterinary Students' Association*) i USIK (Udruga studenata Imotske krajine). Nakon diplomiranja, od 20. lipnja 2016. do 31. siječnja 2018. godine, radio je kao asistent u Zavodu za higijenu, ponašanje i dobrobit životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U tom je razdoblju sudjelovao u izvođenju nastave te stekao iskustvo u laboratorijskom radu pri analizama tla i vode. Tijekom rada na Veterinarskom fakultetu bio je član Fakultetskog vijeća, a akademske godine 2017./2018. bio je član vijeća Biomedicinskog područja te Senata Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstveno se usavršavao sudjelujući na međunarodnim kongresima i simpozijima kao prvi autor ili koautor, a 2017. godine bio je član organizacijskog odbora međunarodnog kongresa „Veterinarska znanost i struka“. Iste godine upisao je poslijediplomski doktorski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, koji trenutno pohađa. Svoju profesionalnu karijeru nastavlja u farmaceutskoj industriji zaposlivši se u tvrtki Sandoz d.o.o. u veljači 2018. godine. Nakon početnog rada na poziciji prodajnog predstavnika, 2019. godine napreduje u ulogu mentora, a 2021. godine preuzima funkciju *Senior medical representative*. U toj ulozi zadužen je za organizaciju rada na terenu, budžetiranje i planiranje poslovnih aktivnosti. Član je Hrvatske veterinarske komore (HVK), Hrvatskog lovačkog saveza (HLS) i Matice hrvatske. Aktivno se služi engleskim jezikom, a pasivno talijanskim. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.

POPIS PUBLIKACIJA

ŽUŽUL, S., I. SABOLEK, G. GREGURIĆ GRAČNER, J. PETRLIĆ, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2026): Effect of condensed (quebracho) and hydrolysable (sweet chestnut) tannins on growth performance and contact dermatitis in broilers. *Cro. Vet. J.* 57, 112-118.

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEIN, E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex differently influence fecal *Escherichia coli* count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. *J. Cent. Eur. Agric.* 26, 606-617.

STARČEVIĆ, K., S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, T. MAŠEK (2025): Tanin kestena i kompleks tanina i proteinskog izolata soje utječu na podložnost oksidaciji, upalu i profil masnih kiselina kod pilića u tovu. *Zbornik sažetaka 30. međunarodnog savjetovanja Krmiva 2025.* Zagreb, pp. 85-86.

ŽUŽUL, S., I. SABOLEK, G. GREGURIĆ GRAČNER, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2025): Primjena kondenziranih (quebracho) i hidrolizirajućih tanina u peradarskoj proizvodnji. *Zbornik sažetaka 30. međunarodnog savjetovanja Krmiva 2025.* Zagreb, pp. 50-51.

SABOLEK, I., S. ŽUŽUL, G. GREGURIĆ GRAČNER, K. STARČEVIĆ, T. MAŠEK (2025): Upotreba tanina u ublažavanju emisija amonijaka iz stočarske proizvodnje. *Zbornik sažetaka 30. međunarodnog savjetovanja Krmiva 2025.* Zagreb, pp. 77-77.

STARČEVIĆ, K., S. HEŠTERA, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, T. MAŠEK (2024): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex influence meat oxidative susceptibility, inflammation and fatty acid profile in broiler chickens. *Zbornik Sažetaka 29. međunarodnog savjetovanja Krmiva 2024.* Zagreb.

GREGURIĆ GRAČNER, G., G. JURKIĆ, M. LIPAR, A. DOVČ, K. VLAHOVIĆ, S. ŽUŽUL, D. GRAČNER (2021): The common causes and indicators of poor welfare in pet rodents. 2nd International Scientific and Professional Meeting on Reptiles and Exotic Animals "Reptilia" Proceedings. Zagreb, pp. 195.

GREGURIĆ GRAČNER, G., Ž. PAVIČIĆ, J. GRIZELJ, D. IVŠIĆ ŠKODA, A. DOVČ, S. ŽUŽUL, M. BENIĆ, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2019): Corticosterone values and blood biochemistry in a model of streptozotocin-induced diabetes: the influence of dietary n6/n3 ratio. Vet. arhiv 89, 885-894.

GREGURIĆ GRAČNER, G., Ž. PAVIČIĆ, S. ŽUŽUL, A. DOVČ, N. LONČARIĆ, J. GRIZELJ (2018): Praćenje razine kortizola u slini mliječnih koza u travnju, svibnju i srpnju u poluintenzivnom sustavu držanja. Vet. stanica 49, 179-185.

TRŠAN, J., I. ŠMIT, D. GRAČNER, D. ŽUBČIĆ, S. ŽUŽUL, D. POTOČNJAK (2019): Kronični proljev u mačaka. Vet. stanica 50, 369-380.

GREGURIĆ GRAČNER, G., K. VLAHOVIĆ, A. DOVČ, B. SLAVEC, LJ. BEDRICA, S. ŽUŽUL, D. GRAČNER (2018): A preliminary study of Chlamydophila felis prevalence among domestic cats in the City of Zagreb and Zagreb County in Croatia. Vet. stanica 49, 1-7.

GREGURIĆ GRAČNER, G., S. ŽUŽUL, N. LONČARIĆ, J. GRIZELJ, A. DOVČ, Ž. PAVIČIĆ, D. GRAČNER (2017): Ruminants' environmental enrichment. 7th International Congress "Veterinary Science and Profession" Book of Abstracts. Zagreb, pp. 107.

PUTAR-ŠEBALJ, A., LJ. BEDRICA, D. GRAČNER, S. ŽUŽUL, G. GREGURIĆ GRAČNER (2017): Turski pastirski pas-Kangal. Hrvat. vet. vjesn. 25, 67-71.

OSTOVIĆ, M., I. RAVIĆ, M. KOVAČIĆ, S. ŽUŽUL, K. MATKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, A. EKERT KABALIN, S. MENČIK, D. HORVATEK TOMIĆ (2017): Pojavnost gljivica na izložnim

površinama u nastambi za tov pilića. Zbornik radova Hrvatski veterinarski institut. Zagreb, pp. 122-126.

MIKIĆ, Z., I. ŽURA ŽAJA, K. MATKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, S. ŽUŽUL, M. OSTOVIĆ (2017): Držanje ovaca i koza u ekološkoj proizvodnji. Meso 19, 317-323.

ŽUŽUL, S., Ž. MESIĆ, T. MIKUŠ, K. MATKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, M. OSTOVIĆ (2017): Attitudes among Croatian veterinary students toward welfare of game animals. 7th International Congress "Veterinary Science and Profession" Book of Abstracts. Zagreb, pp. 79.

GREGURIĆ GRAČNER, G., S. ŽUŽUL, N. LONČARIĆ, J. GRIZELJ, D. GRAČNER, Ž. PAVIČIĆ, A. VOLAJ-BIJELIĆ, A. DOVČ (2017): Protokoli za procjenu dobrobiti koza namijenjenih za proizvodnju mlijeka. Hrvat. vet. vjesn. 25, 46-51.

ŽUŽUL, S., M. OSTOVIĆ, K. MATKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, J. TRŠAN, M. MIKULIĆ, I. RAVIĆ (2017): Uloga duboke stelje u tovu pilića i svinja. Meso 19, 223-228.

NALETILIĆ, Š., S. ŽUŽUL, Ž. PAVIČIĆ, K. MATKOVIĆ, M. OSTOVIĆ (2017): Važnost ambijentalnih uvjeta za zdravlje i proizvodnost ovaca. Vet. stanica 48, 187-192.

OSTOVIĆ, M., S. MENČIK, I. RAVIĆ, S. ŽUŽUL, Ž. PAVIČIĆ, K. MATKOVIĆ, B. ANTUNOVIĆ, D. HORVATEK TOMIĆ, A. EKERT KABALIN (2017): Relation between microclimate and air quality in the extensively reared turkey house. Mac. vet. rev. 40, 83-90.

MIOŠ, B., Ž. PAVIČIĆ, S. ŽUŽUL, D. GRAČNER, M. LIPAR, A. DOVČ, G. GREGURIĆ GRAČNER (2017): Ponašanje laboratorijskih životinja-zamorčiči. Vet. stanica 48, 35-41.

PERKOVIĆ, N., I. ŽURA ŽAJA, Ž. PAVIČIĆ, K. MATKOVIĆ, S. ŽUŽUL, S. MENČIK, M. OSTOVIĆ (2017): Stereotipije svinja. Vet. stanica 48, 51-56.

ŽUŽUL, S., K. MATKOVIĆ, M. OSTOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ (2016): Načela etičnosti u radu s pokusnim životinjama. Zbornik radova Hrvatska veterinarska komora. Zagreb, pp. 417-422.

ŽUŽUL, S. (2016): Mikroklimatski pokazatelji u staji za mliječne krave s osvrtom na zagađenje elektrosmogom. Diplomski rad. Veterinarski fakultet, Zagreb.

ŽUŽUL, S., V. DOBRANIĆ (2016): Annual Report of EFSA and ECDC about zoonoses, zoonotic agents, food-borne and water-borne outbreaks in the European Union in 2014. Veterinar 54, 17-22.

VILIĆ, M., J. PEJAKOVIĆ HLEDE, S. ŽUŽUL, M. MAJER (2015): Effects of low dose gamma-radiation on white blood cells in chicken. Book of Abstracts, The 6th International Congress "Veterinary Science and Profession". Zagreb, pp. 103.

ŽUŽUL, S., M. OSTOVIĆ, I. ŠANDRIĆ, S. MENČIK, Ž. PAVIČIĆ, K. MATKOVIĆ (2015): Microbiological contamination of dairy cow barn air and milk according to seasons. Proceedings. Košice, pp. 128-129.

ŽUŽUL, S., J. PEJAKOVIĆ HLEDE, I. ŽURA ŽAJA, M. MAJER, M. VILIĆ (2015): Adaptivni odgovor koštane srži pijetlova nakon ozračivanja gama zračenjem. Zbornik radova 10. simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja. Zagreb, pp. 115-120.