OKSIDATIIVINEN STRESSI JA ANTIOKSIDANTIT –KIRJALLISUUSKATSAUS TERVEYS- JA LAATUVAIKUTUKSISTA SEKÄ TUTKIMUSMENETELMISTÄ TUOTANTOELÄIMILLÄ

Seija Saastamoinen
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos
Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto
2009

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta - Fakultet – Faculty	Laitos - Institution – Department
Eläinlääketieteellinen tiedekunta	Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos

Tekijä - Författare – Author
Seija Satu Sinikka Saastamoinen

Työn nimi - Arbetets titel – Title
Oksidatiivinen stressi ja antioksidantit –kirjallisuuskatsaus terveys- ja laatuvaikutuksista sekä tutkimusmenetelmistä tuotantoeläimillä

Oppiaine - Läroämne – Subject
Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito

Työn laji - Arbetets art – Level	Aika - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages
Lisensiaatin tutkielma	Syyskuu 2009	60

Tiivistelmä - Referat – Abstract

Oksidatiivinen stressi on tila, jossa elimistön vapaiden radikaalien ja antioksidanttien suhde on epätasapainossa. Tämä voi johtua joko vapaiden radikaalien ylimäärästä tai antioksidanttien puutteesta. Vapailla radikaaleilla tarkoitetaan aineenvaihdunnassa muodostuvia hapen ja typen lajeja, jotka ovat herkästi uudelleen reagoivia. Antioksidantit ovat aineita, jotka viivyttävät, estävät tai poistavat vapaiden radikaalien aiheuttamia vaurioita.

Eläinlääketieteessä tiedetään melko vähän oksidatiivisen stressin vaikutuksesta eläinten terveyteen ja hyvinvointiin. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena oli selvittää mitä antioksidantit ovat, ja mitkä ovat niiden vaikutusmekanismit. Työssä koottiin yhteen kotieläinten ravitsemuksessa eniten tutkittujen antioksidanttien terveys- ja laatuvaikutuksia. Lisäksi työssä selvitettiin antioksidanttien ja oksidatiivisen stressin tutkimusmenetelmiä lypsylehmillä ja lihasioilla. Tavoitteena oli arvioida uusimmissa antioksidanttitutkimuksissa käytettyjen merkkiaineiden, määritysmenetelmien ja koeasetelmien soveltuvuutta tuotantoeläimille.

Oksidatiiviset vauriot kohdistuvat solussa rasvoihin, valkuaisaineisiin tai nukleiinihappoihin. Endogeenisiä antioksidantteja ovat katalaasi, superoksididismutaasi, sekä glutationi- ja tioreduksinjärjestelmään kuuluvat entsyymit. Ravinnosta saataviin antioksidantteihin kuuluvat E- ja C-vitamiini, A-vitamiinin esiasteena tunnettu β-karoteeni, sekä hivenaineet seleeni, kupari ja sinkki. E-vitamiini ja karotenoidit ovat rasvaliukoisia aineita, jotka suojaavat rasvojen hapettumiselta. C-vitamiini ja glutationi ovat vesiliukoisia aineita, jotka voivat suojata rasvojen, valkuaisaineiden ja nukleiinihappojen hapettumiselta. Antioksidantit toimivat yhteistyössä. Hivenaineet toimivat solunsisäisten antioksidanttisten entsyymien, kuten superoksidismutaasin ja glutationiperoksidaasin osana. Antioksidanttit toimivat yhteistyössä.

E-vitamiinilla ja seleenillä on vaikutusta lypsylehmällä poikimisen tienoilla esiintyvien sairauksien, kuten utaretulehduksen, jälkeisten jäämisen ja kohtutulehdusten esiintyvyyteen. Antioksidantteja on tutkittu myös hedelmällisyyteen liittyvien fysiologisten toimintojen yhteydessä. Antioksidanteilla on vaikutuksia lihanlaatuun märehtijöillä ja sioilla. E-vitamiini- ja seleeninlisä vaikuttaa rasvojen härskiintymiseen, lihan väriin, vedensidontakykyyn, rasvahappokoostumukseen ja antioksidanttipitoisuuteen. Karotenoideilla on vaikutusta rasvakudoksen väriin. Antioksidanteilla on vaikutusta myös maidon rasvapitoisuuteen, rasvahappokoostumukseen ja maidon sisältämien antioksidanttien määrään.

Antioksidanttien toimintaa voidaan määrittää mittaamalla suorasti tai epäsuorasti antioksidanttien määrää tai antioksidanttien puutteesta syntyneitä oksidatiivisia vaurioita. Antioksidanttien määrää voidaan mitata joko arvioimalla antioksidanttien kokonaiskapasiteettia tai mittaamalla yksittäisten antioksidanttien määrää nestekromatokrafialla. Nukleiinihappoihin kohdistuvia vaurioita voidaan mitata COMET-analyysillä. Aminohappojen hapettumista voidaan mitata arvioimalla kolorimetrillä karbonyyliryhmien määrää. Rasvojen hapettumista voidaan määrittää mittaamalla malondialdehydin tai isoprostaanien määrää.

Tuotantoeläimiltä verestä ja lihaksesta määritettyjä merkkiaineita ovat esimerkiksi malondialdehydi, glutationi ja muut yksittäiset antioksidantit. Lypsylehmillä oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien tutkimisessa eri merkkiaineiden ja määritysmenetelmien käyttö on vielä vakiintumatonta. Lihasioilla tehdyissä lihanlaatukokeissa tiobarbituraattihappoon perustuva malondialdehydin määritys on eniten käytetty menetelmä rasvojen hapettumisen mittaamiseen. Antioksidanttien tutkimusmenetelmäksi sopivat kliiniset koe-eläinkokeet, joissa koeasetelmana käytetään faktorikoetta.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords
Oksidatiivinen stressi, radikaali, antioksidantti, hapettuminen, E-vitamiini, seleeni, tokoferoli, karoteeni, kupari, sinkki, C-vitamiini, malondialdehydi, utaretulehdus, jälkeisten jäänti, lihanlaatu

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Viikin tiedekirjasto

Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s)
Työn johtaja: Professori Timo Soveri, Kliinisen tuotantoeläinlääketieteenlaitos
Työn ohjaajat: Tuotantoeläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Eeva Mustonen, Kliinisen tuotantoeläinlääketieteenlaitos, MMM Mikko Anttila ja MMT Eija Helander Hankkija-Maatalous Oy

1 Johdanto 1
2 Vapaiden radikaalien muodostuminen ja oksidatiiviset vauriot 2
2.1 Vapaiden radikaalien muodostuminen 2
2.2 Oksidatiiviset vauriot 4
3 Antioksidantit 6
3.1 E-vitamiini 10
3.2 C-vitamiini 12
3.3 Karotenoidit 13
3.4 Seleeni 14
3.5 Sinkki 16
3.6 Kupari 17
4 Oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien vaikutukset lypsylehmillä 18
4.1 Utaretulehdus 19
4.2 Jälkeisten jäänti, kohdun tulehdukset ja hedelmällisyys 21
5 Oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien vaikutukset lihan ja maidon laatuun 23
5.1 Vaikutukset lihan laatuun 23
5.1.1 Märehtijät 23
5.1.2 Siat 25
5.2 Vaikutukset maidon ja ternimaidon laatuun 26
5.2.1 Rasvapitoisuus ja rasvahappokoostumus 26
5.2.2 Antioksidanttien erittyminen maitoon 27
5.2.3 Antioksidanttien vaikutus somaattisten solujen määrään ja ternimaidon vasta-ainepitoisuuksiin 29
6 Antioksidanttien tutkimusmenetelmät 30
6.1 Antioksidanttien ja oksidatiivisen stressin merkkiaineet ja määritysmenetelmät 30
6.1.1 Merkkiaineet ja määritysmenetelmät lypsylehmillä 32
6.1.2 Merkkiaineet ja määritysmenetelmät lihasioilla 35
6.2 Koeasetelmat 35
6.2.1 Koeasetelmat lypsylehmätutkimuksissa 36
6.2.2 Koeasetelmat sikatutkimuksissa 36
7 Yhteenveto ja johtopäätökset 37
7.1 Oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien vaikutukset 37
7.2 Antioksidanttien tutkimusmenetelmät 38
Kiitokset 40
Lähteet 41
Liitteet (1–2) 59

1 JOHDANTO

Oksidatiivinen stressi on tila, jossa elimistön vapaiden radikaalien ja antioksidanttien suhde on epätasapainossa (Halliwell 2007). Tämä voi johtua joko vapaiden radikaalien ylimäärästä tai antioksidanttien puutteesta. Vapailla radikaaleilla tarkoitetaan aineenvaihdunnassa muodostuvia hapen ja typen lajeja (reactive oxygen species eli ROS ja reactive nitrogen species eli RNS), jotka ovat herkästi uudelleen reagoivia muiden aineiden kanssa (Valko ym. 2006). Antioksidantit ovat aineita, jotka viivyttävät, estävät tai poistavat vapaiden radikaalien aiheuttamia vaurioita kohdemolekyylissä (Halliwell 2007). Tällaisia aineita ovat mm. useat vitamiinit, hivenaineet ja entsyymit (Sorg 2004). Viime vuosina on tutkittu runsaasti myös kasveista saatavien fenolien, kuten flavonoidien ja tanniinien antioksidanttisia vaikutuksia (Halliwell & Gutteridge 2007).

Lääketieteessä tiedetään oksidatiivisten vaurioiden olevan yhteydessä moniin sairauksiin, kuten ateroskleroosiin, alzheimerintautiin, parkinsonintautiin, kakkostyypin diabetekseen ja syöpään (Sorg 2004, Valko ym. 2007). Onko oksidatiivinen stressi syy vai seuraus näissä sairauksissa, sitä ei vielä tiedetä (Sorg 2004, Valko ym. 2006). Viime aikoina julkaistu kirjallisuus tukee yleistä käsitystä siitä, että oksidatiivinen stressi aiheuttaa laajaa solutuhoa ympäri elimistöä ja voi johtaa heikentyneeseen immuunipuolustukseen ja tulehdusvasteeseen (Sordillo & Aitken 2009). Immuunipuolustusjärjestelmän solut ovat hyvin herkkiä oksidatiiviselle stressille, koska niiden solukalvot sisältävät paljon hapettumiselle herkkiä monityydyttymättömiä rasvahappoja (Spears & Weiss 2008).

Eläinlääketieteessä tiedetään melko vähän oksidatiivisen stressin vaikutuksesta eläinten terveyteen ja hyvinvointiin (Sordillo & Aitken 2009). Lypsylehmillä oksidatiivisen stressin esiintymistä ja antioksidanttien vaikutuksia on tutkittu paljon poikimisen tienoilla (Miller ym. 1993, Wilde 2006, Andrieu 2008, Mulligan & Doherty 2008, Spears & Weiss 2008, Sordillo & Aitken 2009). Oksidatiivisen stressin on esitetty olevan keskeinen osa patogeneesiä myös naudan hengitystiesairauksissa (Cusack ym. 2008) ja monissa parasiittien aiheuttamissa taudeissa (Asri Rezaei & Dalir-Naghadeh 2006, Saleh 2009). Oksidatiivisen stressin yhteyttä hengitystiesairauksien on tutkittu myös hevosilla (Deaton ym. 2004a, Deaton ym. 2004b, Kirschvink ym. 2008).

Hevosilla oksidatiivisen stressin on todettu olevan yhteydessä myös kovaan fyysiseen harjoitteluun (De Moffarts ym. 2005, De Moffarts ym. 2007, Kirschvink ym. 2008).

Lihantuotantoeläimillä, eli sioilla, naudoilla, vuohilla, lampailla, kalkkunoilla ja broilereilla, antioksidanttien vaikutuksia on tutkittu yhteydessä lihanlaatuun (Buckley ym. 1995, Jensen ym. 1998, Mercier ym. 1998, Mercier ym. 2001, Kessler ym. 2003, Macit ym. 2003, Muramoto ym. 2003, Rebolé ym. 2006, Cummins ym. 2008, Smet ym. 2008). Lisäämällä antioksidantteja lihantuotantoeläinten ruokintaan vaikutetaan lihan säilyvyyteen ja teknisiin ominaisuuksiin (Jensen ym. 1998). Samalla voidaan vaikuttaa myös lihan ravitsemukselliseen laatuun (Dunshea ym. 2005).

Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on selvittää mitä antioksidantit ovat, miten niitä jaotellaan, ja mitkä ovat niiden vaikutusmekanismit oksidatiivisessä stressissä tuotantoeläimillä. Työssä kootaan yhteen kotieläinten ravitsemuksessa eniten tutkittujen antioksidanttisten vitamiinien ja hivenaineiden terveys- ja laatuvaikutuksia. Mukana katsauksessa olivat E-vitamiini eli α-tokoferoli, C-vitamiini eli askorbiinihappo, A-vitamiini esiaste eli β-karoteeni sekä hivenaineista seleeni, kupari ja sinkki. Lisäksi selvitetään antioksidanttien ja oksidatiivisen stressin tutkimusmenetelmiä lypsylehmillä ja lihasioilla. Tavoitteena on koota yhteen ja arvioida uusimmissa antioksidanttitutkimuksissa käytettyjen merkkiaineiden, määritysmenetelmien ja koeasetelmien soveltuvuutta lypsylehmille ja lihasioille.

2 VAPAIDEN RADIKAALIEN MUODOSTUMINEN JA OKSIDATIIVISET VAURIOT

2.1 Vapaiden radikaalien muodostuminen

Vapailla radikaaleilla on yksi tai useampia parittomia elektroneja atomi- tai molekyyliorbitaalillaan, ja ne ovat hyvin herkkiä reagoimaan toisten aineiden kanssa (Valko ym. 2006). Esimerkiksi molekylaarinen happi voi olla itsessään radikaali, jos se esiintyy singlettihapen muodossa (Valko ym. 2007). Singlettihappi on molekylaarisen hapen (O_2) muoto, joka on reaktiivisempi kuin normaali triplettihappi (Sorg 2004). Tämä johtuu elektronikuorilla tapahtuneista spin-luvun muutoksista.

Elimistössä muodostuvat vapaat happiradikaalit ovat peräisin joko mitokondrioista, sytokromi-P-450 metaboliasta, peroksisomeista tai immuunipuolustukseen kuuluvien solujen aktivoitumisesta (Valko ym. 2006). Vapaiden radikaalien tuotto on osa normaalia aerobista metaboliaa (Sordillo & Aitken 2009). Hapen kulutuksen lisääntyminen aineenvaihdunnan kiihtyessä lisää vapaiden radikaalien tuotantoa. Myös karsinogeeniset aineet tai UV-valo voivat lisätä solujen vapaiden radikaalien muodostumista (Sorg 2004).

Tärkein happiradikaali on superoksidianioni ($^{\bullet}O_2^-$), jota syntyy mitokondrioissa elektroninsiirtoketjussa, kun molekylaarinen happi vastaanottaa yhden elektronin sytokromin sijasta (Valko ym. 2007, Sordillo & Aitken 2009) (yhtälö 1).

$$O_2 + e^- \rightarrow {}^{\bullet}O_2^- \qquad (1)$$

Superoksidianioni voi edelleen muuttua mitokondrion sisäkalvolla superoksididismutaasin (SOD) katalysoimana vetyperoksidiksi (H_2O_2) yhtälön 2 mukaisesti (Valko ym. 2007, Sordillo & Aitken 2009).

$$2\ {}^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2 \qquad (2)$$

Superoksidianionia ja vetyperoksidia tuotetaan aktivoituneissa neutrofiileissä ja makrofageissa nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin (NAD(P)H) avulla oksidatiivisessa purkauksessa (Sorg 2004). Oksidatiivinen purkaus tapahtuu esimerkiksi tulehdusreaktion yhteydessä. Näiden radikaalien tuottoa tapahtuu myös kaikissa muissa soluissa, joissa on endogeenisiä oksidaasientsyymejä, kuten esimerkiksi myeloperoksidaasia.

Vapaita happiradikaaleja tuottava ketjureaktio jatkuu, kun vetyperoksidi voi edelleen reagoida hapen kanssa ja muodostaa superoksidianionia reaktiivisemman hydroksyyliradikaalin ($OH^{\bullet}$) vapaiden metalli-ionien katalysoimana Haber-Weiss (yhtälö 3) ja Fentonin reaktiossa (yhtälö 4).

$$^{\bullet}O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{3+}\ tai\ Cu^{2+}} O_2 + OH^- + OH^{\bullet} \qquad (3)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \quad (4)$$

Vapailla rautaioneilla uskotaan olevan tärkeä osuus vapaiden happiradikaalien tuotannossa (Kakhlon & Cabantchik 2002). On esitetty, että normaali tilanteessa solujen sisällä ei ole ollenkaan vapaata rautaa, vaan rauta on sitoutuneena solun sisällä oleviin molekyyleihin (Valko ym. 2006). Stressitilanteessa SOD:n ylimäärä vapauttaa raudan molekyyleista ja vapautunut rauta mahdollistaa Fentonin reaktion tapahtumisen.

Vapaita typpiradikaaleja eli typpioksidianionia ($NO^{\bullet}$) ja peroksinitraattianionia ($ONOO^-$) elimistössä muodostuu suuria määriä etenkin immuunipuolustukseen kuuluvien solujen oksidatiivisessa purkauksessa (Valko ym. 2007). Peroksinitraattianioni muodostuu, kun oksidatiivisessa purkauksessa yhtä aikaa muodostunut superoksidianioni ja typpioksianioni reagoivat yhdessä (yhtälö 5).

$$NO^{\bullet} + {}^{\bullet}O_2^- \rightarrow ONOO^- \quad (5)$$

2.2 Oksidatiiviset vauriot

Vapaiden radikaalien aiheuttamaa solutuhoa kutsutaan oksidatiiviseksi vaurioksi (Halliwell 2007). Oksidatiiviset vauriot kohdistuvat solussa rasvoihin, valkuaisaineisiin tai DNA:n sisältämiin nukleiinihappoihin. Mitokondrion DNA:ta pidetään herkempänä oksidatiivisille vauriolle kuin tuman DNA:ta, koska mitokondriossa muodostuu paljon superoksidia ja vetyperoksidia runsaan hapen kulutuksen takia (Valko ym. 2006). Mitokondriossa DNA:n korjausmekanismit eivät ole niin monipuoliset kuin tumassa eikä mitokondrion DNA:ssa ole histoneita. DNA:n vauriot solussa johtavat mutageenisten ja karsinogeenisten prosessien käynnistymiseen ja mitokondrion toimintahäiriöihin.

Rasvoista herkimpiä oksidatiivisille vaurioille ovat monityydyttymättömät rasvahappotähteet (polyunsaturated fatty acids, PUFA) (Valko ym. 2006). Mitä pidempi hiiliketju rasvahapossa on, ja mitä enemmän siinä on kaksoissidoksia, sitä herkempi se on vapaiden radikaalien vaikutukselle (Högberg 2002). Rasvahappojen sisältämät metyleeniryhmät ovat erityisen herkkiä hapettumaan Fentonin reaktiossa syntyneen hydroksyyliradikaalin tai singlettihapen vaikutuksesta (Valko ym. 2006). Vapaan radikaalin hyökkäys PUFA:an johtaa oksidatiiviseen ketjureaktioon, jota

kutsutaan myös peroksidaatioksi (Valko ym. 2006) tai auto-oksidaatioksi (Högberg 2002). Peroksidaatio voidaan jakaa aloitusvaiheeseen, etenemisvaiheeseen ja päättymisvaiheeseen (Valko ym. 2006). Aloitusvaiheessa rasvahaposta (RH) syntyy rasvahapporadikaali ($R^{\bullet}$) vapaan radikaalin vaikutuksesta (Halliwell & Gutteridge 2007). Myös metalli, kuumuus tai valo voi aiheuttaa peroksidaation käynnistymisen (yhtälö 6) (Högberg 2002).

RH + vapaa radikaali/metalli/kuumuus/valo → $R^{\bullet}$ (yhtälö 6)

Etenemisvaiheessa rasvahapporadikaali reagoi hapen kanssa muodostaen peroksyyliradikaalin ($ROO^{\bullet}$), joka reagoi herkästi uuden rasvahapon kanssa (yhtälö 7) (Halliwell & Gutteridge 2007). Tästä muodostuu uusi rasvahapporadikaali ja lipidivetyperoksidi (ROOH) (yhtälö 8).

$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (yhtälö 7)

$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$ (yhtälö 8)

Päättymisvaiheessa kaksi peroksyyliradikaalia reagoi keskenään muodostaen lipidivetyperoksidia ja singlettihapen (yhtälö 9) (Halliwell & Gutteridge 2007).

$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOH + O_2$ (yhtälö 9)

Peroksyyliradikaalit voivat päättymisvaiheen reaktion sijasta reagoida myös itsensä kanssa muodostaen erilaisten syklisten välivaiheiden kautta lopulta malondialdehydiä (MDA) tai muita aldehydejä (Halliwell & Gutteridge 2007). Peroksyyliradikaaleista voi muodostua myös hapen avustuksella isoprostaaneja ja isofuraaneja tai metallien avustuksella alkoksyylejä, joista edelleen muodostuu hiilivetyjä, kuten pentaania. MDA on mutageeninen aine, koska se voi reagoida DNA:n emästen kanssa.

Lipidien lisäksi vapaat radikaalit voivat myös hapettaa proteiineja (Sorg 2004). Aminohapposivuketjujen tai pääketjun hapettuminen johtaa proteiinien toiminnan häiriintymiseen (Berlett & Stadtman 1997). Solutasolla proteiinien oksidatiiviset vauriot tarkoittavat reseptorien, vasta-aineiden, entsyymien, signaalin välitys- ja kuljetusproteiinien toiminnan häiriintymistä (Halliwell 2007). Proteiinien

peroksidaatiosta on yleensä vastuussa hydroksyyliradikaalit, mutta myös superoksianioni tai vetyperoksidi voivat osallistua aminohappojen hapettamiseen (Kankofer 2002).

3 ANTIOKSIDANTIT

Antioksidantit voivat olla endogeenisiä eli valmistettu *in vivo* tai ne voivat olla peräisin ravinnosta, jolloin puhutaan eksogeenisistä antioksidanteista (Halliwell & Gutteridge 2007). Antioksidantit voidaan ryhmitellä myös niiden toimintatavan mukaan vapaiden radikaalien syntyä estäviin tai radikaaliketjureaktiota hillitseviin aineisiin (Miller ym. 1993).

Vapaiden radikaalien syntyä estäviin aineisiin kuuluvat vapaita metalleja sitovat makromolekyylit ja entsyymeinä toimivat antioksidantit. Metalleja sitovia, endogeenisiä makromolekyylisiä antioksidantteja solun ulkoisessa nesteessä ovat esimerkiksi keruloplasmiini, transferriini ja albumiini (Miller ym. 1993). Solujen sisällä antioksidanttisesta puolustuksesta vastaavia entsyymejä ovat katalaasit (CAT), superoksididismutaasit (SOD), glutationiperoksidaasit (GPX) sekä tioreduksinjärjestelmä (TRX) (Miller ym. 1993, Sordillo ym. 2007). Katalaasit sijaitsevat solujen sisällä peroksisomeissa, ja ne edistävät tehokkaasti vetyperoksidin muuttumista vedeksi ja hapeksi. SOD:t ovat puolestaan entsyymeitä, jotka katalysoivat superoksidin muuttumista vetyperoksidiksi (yhtälö 2) (Valko ym. 2006). SOD:eja on löydetty useita muotoja ja sen aktiiviseen kohtaan voi olla sitoutunut joko kupari (Cu) tai mangaani (Mn). GPX- ja TRX ovat selenoentsyymejä, joissa on selenokysteiinitähde aktiivisessa kohdassa entsyymiä. Näillä entsyymeillä on tärkeä rooli vetyperoksidin ja lipidivetyperoksidien pelkistämisessä vedeksi ja alkoholiksi (Sordillo & Aitken 2009). Nautojen aortan endoteelisoluista on löydetty uusissa tutkimuksissa myös seleenistä riippumattomia antioksidanttisia entsyymejä, kuten hemioksygenaasi, mutta näiden antioksidattista merkitystä ei vielä ole selvitetty *in vivo* (Trigona ym. 2006).

Radikaaliketjureaktioita sammuttavat antioksidantit voidaan jakaa rasva- ja vesiliukoisiin. Esimerkiksi eksogeenisiin antioksidantteihin kuuluvat E-vitamiini (α-tokoferoli) ja karotenoidit ovat rasvaliukoisia aineita, jotka pääasiassa suojaavat

rasvojen hapettumiselta (Kirschvink ym. 2008). Myös flavonoidit kuuluvat tähän ryhmään. Eksogeenisiin antioksidantteihin kuuluva C-vitamiini (askorbiinihappo) ja endogeenisiin antioksidantteihin kuuluvat glutationi (GSH) ovat vesiliukoisia aineita, jotka voivat suojata sekä rasvojen että proteiinien ja nukleiinihappojen hapettumiselta (Naguib 2000, Valko ym. 2006, Kirschvink ym. 2008).

Glutationi (GSH) on tärkeä tioleihin kuuluva tripeptidi (Valko ym. 2006). Sen antioksidanttinen vaikutus perustuu moniin seikkoihin. Sillä on mm. kyky muodostaa hapettuessaan disulfidisilta kahden glutationi molekyylin välille, jolloin glutationi hapettuu (GSSH). Rikkiatomi mukautuu helposti yksittäisen elektronin menetykseen. Tällä tavoin glutationi voi pelkistää hydroksyyliradikaaleja tai singlettihappea. Glutationi on myös koentsyyminä useissa entsyymeissä, jotka toimivat oksidatiivisen stressin puolustuksessa (mm. glutationiperoksidaaseissa).

Antioksidantit toimivat usein yhteistyössä. Esimerkiksi C-vitamiini toimii yhteistyössä E-vitamiinin ja A-vitamiinin kanssa (Valko ym. 2006). C-vitamiini voi pelkistää α-tokoferyyliradikaalin takaisin α-tokoferoliksi. Myös glutationi voi pelkistää C- ja E-vitamiinin takaisin niiden antioksidanttina toimivaan muotoon. Tietyissä kemiallisissa olosuhteissa myös karotenoideilla ja α-tokoferolilla on todettu olevan hyödyllisiä vaikutuksia toisiinsa (Mortensen ym. 2001). Yhteisvaikutuksia on myös vitamiinien ja hivenaineiden välillä. Näistä seleenin ja E-vitamiini yhteys on tunnettu jo pitkään (Neelesh 2007, Heinrichs ym. 2009). E-vitamiini on rasvaliukoinen antioksidantti, joka tekee vaarattomaksi vetyperoksidia ja lipidiperoksideja solukalvolla ja seleeni toimii samoissa tehtävissä solun sisällä (Neelesh 2007).

Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen rehutaulukoiden mukaan hyviä E-vitamiinin ja karoteenien lähteitä eläimille ovat tuoreet ja tuoresäilötyt nurmi- ja palkokasvit (MTT 2006). Laidunasteella ne sisältävät 300 kansainvälistä yksikköä (k.y.) E-vitamiinia eli 300 mg DL-α-tokoferoliasetaattia ja karoteenia 300 mg / kg rehun kuiva-ainetta (ka). Pitoisuudet laskevat, kun kasvit vanhenevat tai niitä varastoidaan. Hyvälaatuisessa nurmisäilörehussa karoteenia on 125 mg / kg ka. Hyvälaatuisessa timoteiheinässä on E-vitamiinia 40 k.y / kg ka. Viljaperäisissä rehuissa E-vitamiinia on eniten vehnän alkioissa (150 mg DL-α-tokoferoliasetaattia / kg ka). Karoteenia nurmirehujen lisäksi on melko paljon myös lantun ja rehukaalin naateissa

(250 ja 120 mg / ka kg). C-vitamiinipitoisuuksia ei suomalaisissa rehutaulukoissa ole määritetty.

Ulkomaisessa rehuhiivassa seleeniä on 0,50 mg / kg rehun ka (MTT 2006). Kotoisista rehuista parhaimpia seleenin lähteitä ovat tuoreet nurmikasvustot ja säilörehu, joissa seleeninpitoisuus on 0,20–0,31 mg / kg ka. Hyviä kuparin lähteitä eläinten ruokinnassa ovat panimohiiva (64 mg / kg ka) ja palmuydinpuriste (43 mg / kg ka). Näitä aineita käytetään kaupallisten väkirehujen ainesosana (Anttila, henkilökohtainen tiedonanto). Korkeimmat sinkkipitoisuudet ovat vehnänalkioissa (207 mg / kg ka), vehnäleseessä (337 mg / kg ka), sokerijuurikkaan naateissa (200 mg / kg ka) ja sokerijuurikkaan naateista tehdyssä säilörehussa (250 mg / kg ka). Ohrassa, kaurassa, nurmi- ja vihantarehuissa kuparipitoisuudet vaihtelevat 4–18 ja sinkin pitoisuudet 30–67 mg / kg ka välillä.

Märehtijöille E-vitamiinin tarvetta ei ole täsmällisesti määritelty, koska E-vitamiinin tarve riippuu paljon muista rehun antioksidanteista, rikkipitoisista aminohapoista, seleenistä, ja rasvan määrästä dieetissä (NRC 2000). E-vitamiinin määrä perusrehuissa voi vaihdella hyvin paljon, koska tuoreet nurmirehut sisältävät huomattavasti enemmän E-vitamiinia kuin säilörehu. E-vitamiinin suomalainen suositus lehmille on 15 k.y. / kg ka (MTT 2006). Suositus on saman suuruinen kaikille tuotantovaiheille. Amerikkalaisen Nutrient research councilin eli NCR:n ravintoainevaatimusten mukaan lypsylehmien ja hiehojen E-vitamiini tarve 60 vuorokautta ennen poikimista on 1,6 k.y. / elopaino kg eli noin 80 k.y. / kg ka (NRC 2001). Annettu vaatimus koskee vain lisäruokintana annettua E-vitamiinia ja sen oletus on, että lehmien perusrehuna on säilötty nurmi- tai vihantarehu. Lopputiineydestä ja lypsäville annettu NRC:n kokonaistarve E-vitamiinille on 2,6 k.y. / elopaino kg ja 1 k.y. / elopaino kg ummessa oleville sisältäen perusrehun ja lisänä annetun E-vitamiinin.

Suomalainen suositus A-vitamiinin tarpeesta lypsylehmille on 4 000 k.y. / kg ka kolmen ensimmäisen viikon aikana poikimisen jälkeen, 3 200 k.y. / kg ka lypsäville ja 4 000 k.y. / kg ka ummessa oleville (MTT 2006). NCR:n määrittelemä tarve A-vitamiinille on 2 200 k.y. / kg ka kasvaville lihanaudoille, 2 800 k.y / kg ka tiineille hiehoille ja lehmille ja 3 900 k.y. / kg ka lypsäville lehmille (NRC 2000). NRC:n mukaan lypsylehmälle A-vitamiinin tarve on 110 k.y. / elopaino kg (NRC 2001). A- ja E-

vitamiini ovat hyvin siedettyjä suurinakin pitoisuuksina, eikä varsinaisia myrkyllisyysrajoja ole määritetty märehtijöillä. C-vitamiinista suosituksia ei ole.

NRC on määrittänyt kuparin tarpeeksi naudoille 10,00 mg / kg rehua (NRC 2000). Kupari on myrkyllistä yli 100 mg / kg rehua annoksina naudoille. Sinkille tarve on 30 mg / kg ja myrkyllisyys raja 500 mg / kg. Tarpeet ovat samat kasvuaikana, tiineydessä ja varhaisella lypsykaudella. Kuparin ja sinkin tarve lypsäville lehmille vaihtelee eri lähteiden mukaan (NRC 2001). Esimerkiksi 40 kg lypsävälle lehmälle NRC:n mukaan kuparin tarve on 15,7 mg / kg ka ja sinkin tarve 63 mg / kg ka. ARC:n mukaan kuparin tarve on 10,7 mg / kg ka ja sinkin 47,3 mg / kg ka (NRC 2001). Poikimispäivänä tarve on NRC:n mukaan kuparille on 13,7 mg / kg ka ja sinkille 22,8 mg / kg ka. ARC:n vastaavat vaatimukset ovat kuparille 13,9 mg / kg ka ja sinkille 14,8 mg / kg ka. Seleenin tarve naudoilla on 0.10 mg / kg ja myrkyllisyys raja 2,0 mg / kg rehua (NRC 2000). Lypsylehmille NCR:n määrittelee seleenin tarpeeksi 0,3 mg / kg ka (NRC 2001). Suomalaisissa rehutaulukoissa ja ruokintasuosituksissa lypsylehmille suositellaan kuparia 10 mg / kg ka, sinkkiä 50 mg / kg ka ja seleeniä 0,1 mg / kg ka (MTT 2006).

Sioille NCR määrittelee kuparin tarpeeksi 5–6 ppm ja sinkin tarpeeksi 15–50 ppm (NRC 1998). Seleenin tarve vaihtelee 0.15 ppm:sta (parts per million) 0.3 ppm:ään. Sinkin ja seleenin tarpeeseen sioilla vaikuttaa mm. dieetin fosforipitoisuus. E-vitamiinin tarpeeksi NCR määrittelee emakoille tiineyden ja maidontuotannon aikana 44 k.y. / kg rehua. Sikojen A-vitamiinitarpeeksi 2100 k.y. / pv. Yksi kansainvälinen yksikkö A-vitamiinia vastaa 0,344 μg retinyyliasetaattia. Siat eivät ole niin tehokkaita muuttamaan karotenoideja A-vitamiiniksi kuin siipikarja. Sioilla 1 mg karotenoideja vastaa 276 k.y. A-vitamiinia.

Suomalaisissa ruokintasuosituksissa sikojen rehujen kuparipitoisuudeksi suositellaan 6 mg / rehuyksikkö (ry), sinkkipitoisuudeksi 100 mg / ry ja seleenipitoisuudeksi 0,2 mg / ry (MTT 2006). E-vitamiinin suositus on emakoille 50 mg / ry ja muille sioille 40 mg / ry. A-vitamiinin suositus emakoille on 8000 k.y. / ry ja muille sioille 5000 k.y. / ry.

3.1 E-vitamiini

E-vitamiiniin kuuluu neljä tokoferolia (α, β, γ ja δ) ja neljä tokotrienolia (α, β, γ ja δ) (Mustacich ym. 2007). E-vitamiinin perusrakenteeseen kuuluu kromanolirengas ja hiiliketjusta muodostuva häntä. Tokotrienoleilla hännässä on kolme kaksoissidosta, mutta tokoferoleilta kaksoissidokset puuttuvat. α, β, γ ja δ -muodot eroavat metyyliryhmien sijainnin ja lukumäärän suhteen. α-tokoferoli on tärkeä solukalvoilla sijaitseva antioksidantti (Valko ym. 2006). Tokoferolit pystyvät katkaisemaan rasvahappojen auto-oksidaation luovuttamalla vetyionin rasvahapporadikaalille tai peroksyyliradikaalille. Samalla ne itse muuttuvat tokoferoksyyliradikaaleiksi.

α-tokoferoli on E-vitamiineista tutkituin (Mustacich ym. 2007). Sillä on kolme kiraalista hiiltä (2., 4. tai 8. hiili), joiden asennosta (R tai S) johtuen α-tokoferolista voi esiintyä kahdeksan erilaista isomeeria: RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS ja SSS. Luonnossa eniten esiintyy muotoa RRR-α-tokoferoli, jota on aiemmin kutsuttu myös L-α-tokoferoliksi (Jensen & Lauridsen 2007). E-vitamiinia kemiallisesti valmistettaessa muodostuu all-rac-α-tokoferolia eli aikaisemmalta nimeltään DL-α-tokoferolia, joka sisältää kaikkia kahdeksaa isomeeria yhtä paljon.

Maidossa E-vitamiini on alkoholimuodossa, eli ns. vapaana α-tokoferolina (Jensen & Lauridsen 2007). Lisäruokintana annettu E-vitamiini on useimmiten α-tokoferoliasetaattina. Kaupalliset E-vitamiinilisät voidaan jakaa täysin synteettisiin, luonnollisiin ja puolisynteettisiin aineisiin. Täysin synteettinen all-rac-α-tokoferoli on usein asetaattiesterinä. Luonnolliset RRR-α-tokoferolit saadaan puhdistamalla kasviöljyistä. Semisynteettinen α-tokoferoli on lähtöisin kasviöljyistä, mutta sen sisältämiä β-, γ- ja δ-tokoferoli isomeereja on muokattu estereiksi asetaatti- tai sukkinaattihapolla sekä lisätty metyyliryhmiä, jotta RRR-α-tokoferoliesterien määrä nousisi.

Maksalla on keskeinen rooli α-tokoferolin vapauttamisessa verenkiertoon ja edelleen kudoksiin. Maksassa muodostuu α-tokoferolin kuljettaja proteiinia (tocopherol transfer protein, TTP), joka siirtää E-vitamiinin VLDL (very low density lipoproteins) -kolesterolipartikkeleihin ja edelleen verenkiertoon. Joissakin fysiologisissa tiloissa, tai proteiinin puutoksen seurauksena, TTP:n tai VLDL:n määrä ja α-tokoferolin siirtyminen kudoksiin vähenee.

Esterimuodossa olevan α-tokoferolin on hydrolysoiduttava suolessa haiman esteraasien avulla ennen kuin se voi imeytyä suolistosta (Buckley ym. 1995, Mustacich ym. 2007). E-vitamiinin imeytyminen suolistosta on kytkeytynyt tiukasti rasvojen imeytymiseen (Baldi 2005). Lypsylehmillä tehdyssä tutkimuksessa rasvalisän antaminen puolessa välissä lypsykautta tehosti E-vitamiinilisän vaikutusta lisätä plasman α-tokoferolipitoisuutta (Weiss & Wyatt 2003). Alkulypsykaudella olevilla lehmillä rasvalisän ei ole kuitenkaan havaittu vaikuttavan plasman tokoferolipitoisuuksiin (Baldi ym. 2000). Sioilla rasvalisä E-vitamiinilisän annon yhteydessä lisäsi seerumin α-tokoferolipitoisuutta enemmän kuin pelkkä E-vitamiinilisä (Moreira & Mahan 2002). Lypsylehmillä on havaittu, että plasman E-vitamiinipitoisuus vähenee jyrkästi poikimisen lähellä (Baldi 2005). Tämän on esitetty olevan yksi mekanismi poikimisen tienoilla tapahtuvalle immunosupressiolle. Vähentynyt kuiva-aineen syönti ja E-vitamiinin erittyminen ternimaitoon eivät riitä selittämään tätä pudotusta. Onkin esitetty, että E-vitamiinin jakautumisessa kudoksiin tapahtuisi tällöin muutoksia.

NRC:n mukaan 1 mg all-rac-α-tokofeoliasetaattia, 0,74 mg RRR-α-tokofeoliasetaattia, 0,91 mg all-rac-α-tokofeolia tai 0,67 mg RRR-*α*-tokofeolia vastaa yhtä kansainvälistä yksikköä (k.y.) (NRC 2000). Kaikki ravitsemusasiantuntijat eivät ole samaa mieltä all-rac- ja RRR-muodon hyväksikäytettävyydestä elimistössä (Lauridsen ym. 2002b, Blatt ym. 2004, Weiss ym. 2009). Blatt:n ym. (2004) mukaan all-rac- ja RRR-isomeerille ei voida laskea mitään suhdetta, koska aineet ovat kemiallisesti erilaisia ja noudattavat elimistössä erilaisia aineenvaihduntareittejä. Baldin (2005) mukaan TTP:n affiniteetti ei ole sama tokoferolien eri isomeerien välillä. Useissa nauta- ja sikatutkimuksissa luonnollinen RRR-α-tokoferoli on lisännyt enemmän seerumin α-tokoferolipitoisuutta kuin synteettinen all-rac-α-tokoferoli (Meglia ym. 2006, Jensen & Lauridsen 2007, Wilburn ym. 2008, Weiss ym. 2009). Weissin ym. (2009) mukaan 1 g all-rac-α-tokofeoliasetaattia vastaa 0,5 g RRR-*α*-tokofeoliasetaattia. Sioilla synteettisen all-rac-α-tokoferolin hyväksikäytettävyyden on useissa tutkimuksissa esitetty olevan puolet luonnollisen RRR-α-tokoferolin hyväksikäytettävyydestä (Lauridsen ym. 2002a, Lauridsen ym. 2002b, Jensen & Lauridsen 2007).

E-vitamiinin vaikutuksia on tutkittu sikojen ja nautojen immuniteettiin vaikuttavana tekijänä (Fragou ym. 2004, Cusack ym. 2009). E-vitamiinin vaikutuksen immuniteettiin on esitetty perustuvan sen kykyyn vaikuttaa neutrofiilien ja makrofagien

kemotaktikseen, ekstravasaatioon, migraatioon, sekä kykyyn lisätä neutrofiilien oksidatiivisessä purkauksessa muodostuvan superoksidianionin määrään (Spears & Weiss 2008). Porsailla tehdyssä tutkimuksessa E-vitamiinilisän havaittiin vaikuttavan makrofagien ja neutrofiilien sisältämään urokinaasi-plasminogeeni aktivaattoriin (Fragou ym. 2004). Kudoksiin vaeltavat neutrofiilit ja makrofagit pystyvät muuttamaan proteolyyttisesti epäaktiivisen plasminogeenin aktiiviseksi plasmiiniksi urokinaasi-plasminogeeni-aktivaatio-reseptorin avulla. Plasmiinin avulla neutrofiilit ja makrofagit pystyvät vaeltamaan paremmin kudoksiin. Plasmiini aktivoi mm. metalloproteinaaseja. Lisäksi Fragoun ym. (2004) tutkimuksessa havaittiin, että E-vitamiinilisää saaneiden porsaiden neutrofiilit tuottivat enemmän superoksianionia oksidatiivisessa purkauksessa kuin ilman E-vitamiinilisää olleet porsaat.

Cusacin ym. (2009) tekemän tutkimuksen mukaan E-vitamiinilisän antaminen pistoksena lihanaudoille ei ole kannattavaa. Cusacin ym. (2009) tutkimus oli meta-analyysi, jossa koottiin yhteen 35 eri kokeen tuloksia E-vitamiinin vaikutuksista lihanautojen sairastavuuteen, päiväkasvuun ja rehuhyötysuhteeseen. Vasikoilla E-vitamiinipistoksen on havaittu lisäävän plasman antioksidanttitasoa ja vähentävän malondialdehydin määrää enemmän kuin suun kautta annetun E-vitamiinilisän (Mokhber-Dezfouli ym. 2008).

E-vitamiinin antioksidanttisia vaikutuksia on tutkittu paljon poikimisen tienoilla olevalla lehmällä. Näistä tutkimustuloksista tarkemmin kappaleessa 4. Märehtijöillä ja sioilla E-vitamiinia on tutkittu lihanlaatuun vaikuttavana tekijänä. Näitä tutkimuksia on käsitelty kappaleessa 5.

3.2 C-vitamiini

C-vitamiini on kahdenarvoinen happo ($AscH_2$) ja elimistössä se on fysiologisessa pH:ssa 99,9 % askorbaatti-suolana (Valko ym. 2006). Vapaiden radikaalien kanssa reagoidessaan se luovuttaa vetyionin ja muodostuu semidehydroaskorbaattiradikaali. Askorbaatti voi reagoida superoksidianionin, hydroksyyliradikaalin tai vesifaasissa olevan peroksyyliradikaalin kanssa (Halliwell & Gutteridge 2007).

C-vitamiinia ei pidetä välttämättömänä ravinteena sioille ja naudoille, koska askorbiinihappoa syntyy sikojen ja yli 3 viikkoa vanhojen nautojen elimistössä (NRC

1998, NRC 2001). C-vitamiinin on havaittu vaikuttavan nautojen hengitystie-infektioista paranemiseen (Cusack ym. 2008). Cusackin ym. (2008) tutkimuksessa saatiin viitteitä siitä, että C-vitamiini-injektio yhdessä antibiootti käsittelyn kanssa saattaa vähentää lihanautojen kuolleisuutta BRD:hen (bovine respiratory disease) .

Emakoilla C-vitamiinilisän antamisen on havaittu kiihdyttävän lymfosyyttien erilaistumisjakautumista (Pinelli-Saavedra ym. 2008). Pinelli-Saavedran ym. (2008) tutkimuksessa yhtäaikaisen C-vitamiini- ja E-vitamiinilisän antaminen emakoille tiineys- ja imetyskaudella lisäsi porsaiden plasman vasta-ainepitoisuuksia. Lisä vaikutti erityisesti IgG:hen. C-vitamiinin antamisen porsaille vieroituksen jälkeen on todettu lisäävän myös porsaiden maksan ja seerumin α-tokoferoli- ja IgM-pitoisuuksia (Lauridsen & Jensen 2005).

Askorbiinihapon ja oksidatiivisen stressin osuutta hengitystiesairauksiin on tutkittu hevosilla (Deaton ym. 2004a). Deatonin ym. (2004a) tehdyssä tutkimuksessa askorbiinihappopitoisuus keuhkoputkista ja keuhkorakkuloista saadussa nesteessä oli vähentynyt hengitystieinfektiota sairastavilla hevosilla. Sairaiden hevosten uloshengitysilmassa vetyperoksidinpitoisuus oli kasvanut verrattuna terveisiin hevosiin (Deaton ym. 2004b). Deatonin tutkimuksessa pääteltiin hengitystiesairauksista kärsivien hevosten mahdollisesti hyötyvän C-vitamiinilisästä.

3.3 Karotenoidit

Karotenoidit ovat aineita, jotka kemiallisesti kuuluvat tetraterpenoideihin (Dunne ym. 2009). Niillä on 40:stä hiiliatomista koostuva runko, jossa on paljon kaksoissidoksia. Karotenoidien antioksidanttiset vaikutukset perustuvat pääasiassa niiden kykyyn muodostaa helposti konjugoituja kaksois-sidoksellisia rakenteita, joihin vapaiden radikaalien parittomat elektronit delokalisoituvat (Mortensen ym. 2001). Karotenoideilla on myös muita tapoja reagoida radikaalien kanssa ja siksi ne pystyvät pelkistämään monenlaisia radikaaleja, kuten singlettihappea, peroksyylejä, hydroksyylejä ja superoksidia (Valko ym. 2006).

Karotenoidit jaetaan kemiallisesti karoteeneihin ja ksantofylleihin (Dunne ym. 2009). Karoteenit ovat puhtaasti hiilivetyjä, ja ksantofyllit ovat niiden happea sisältäviä johdannaisia. Karotenoidien erityispiirre on niiden voimakas kellertävä tai oranssi väri.

Eniten kellertävää pigmenttiä on β-karoteenissa, vähiten luteiinissa. Karotenoideihin kuuluvia aineita tunnetaan yli 600 luonnossa (Valko ym. 2006). Rehukasveissa esiintyvä karotenoidi on yleensä all-trans-β-karoteeni, mutta kasveissa esiintyy myös ksantofylleihin kuuluvia aineita, kuten luteiinia, violaksantiinia ja kseaksantiinia. β-karoteenista on olemassa useita isomeereja, mutta kirjallisuudessa niitä ei ole yleensä eritelty.

Aikaisemmin karotenoidien tutkimus on keskittynyt tutkimaan karotenoidien kykyä muuttua A-vitamiiniksi (Dunne ym. 2009). Uusimmissa tutkimuksissa on keskitytty tutkimaan myös karotenoideja, jotka eivät voi toimia A-vitamiinin esiasteena (Chew & Park 2004). Näitä aineita ovat esimerkiksi luteiini, kantaksantiini, lykopeeni ja astaksantiini. Näiden yhdisteiden on todettu vahvistavan soluvälitteistä ja vasta-aineisiin perustuvaa immuniteettia yhtä paljon tai jopa enemmän kuin A-vitamiinin esiasteena toimivan β-karoteenin. Näin ollen karotenoidien antioksidanttiset vaikutukset ovat erillään karotenoidien A-vitamiinin esiasteena toimimisesta.

Naudoilla ja sioilla β-karoteenin on todettu lisäävän lymfosyyttien erilaistumisjakaantumista (Chew & Park 2004). β-karoteenin on todettu lisäävän neutrofiilien tappamiskykyä lypsylehmällä poikimisen tienoilla (Daniel ym. 1991). β-karoteenia on tutkittu myös naudanlihan laatuun ja säilyvyyteen vaikuttavana tekijänä. Näistä tutkimuksista on kerrottu kappaleessa 5.

Astaksantiinin on todettu olevan yli 10 kertaa voimakkaampi antioksidantti *in vitro* kuin β-karoteenin, kseaksantiinin, luteiinin tai kantaksantiinin (Naguib 2000). Astaksantiini on paitsi tärkeä pigmentin lähde kalankasvatuksessa (Ingle de la Mora ym. 2006), mutta mahdollisesti myös kalojen terveyteen vaikuttava tekijä (Nakano ym. 1995). Nakanon ym. (1995) tekemän tutkimuksen mukaan astaksantiini vaikuttaa maksan toimintaan ja vähentää seerumin rasvahappoperoksidien määrää. Kalojen lihan väriin vaikuttavana tekijänä on tutkittu myös kantaksantiinia (Choubert & Storebakken 1989).

3.4 Seleeni

Seleeni on tärkeä ainesosa monissa selenoentsyymeissä (Andrieu 2008). Nisäkkäillä tunnetaan 25 erilaista selenoentsyymiä, mutta monien selenoentsyymien tehtävä elimistössä on edelleen epäselvä. Tutkimusten mukaan monet seleenin

terveysvaikutuksista naudoilla välittyvät kappaleessa 3 esiteltyjen selenoentsyymien GPX:n ja TRX:n välityksellä (Sordillo & Aitken 2009). GPX:t on tunnettu jo pitkään, ja plasman tai solujen sisältämää GPX-pitoisuutta onkin käytetty arvioidessa nautojen seleenistatusta (Kupiainen ym. 2004, Sordillo & Aitken 2009). TRX ja joukko muita selenoentsyymejä on löydetty naudoilta vasta 2000- luvulla (Grignard ym. 2005, Sordillo ym. 2007).

GPX:t voivat pelkistää vetyperoksideja glutationin (GSH) avustuksella (Sordillo & Aitken 2009) (yhtälö 10). GSH hapettuu samalla kun vetyperoksidi pelkistyy GPX:n katalysoimassa reaktiossa. Hapettunut glutationi (GSSG) pelkistyy takaisin GSH:ksi glutationireduktaasin (GR) avulla (yhtälö 11).

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GPX} 2\,H_2O_2 + GSSG \qquad (10)$$

$$GSSH + NADPH \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2\,GSH \qquad (11)$$

Thioreduksinjärjestelmä voi pelkistää hapettuneita proteiineja muodostamalla disulfidisidoksia thioreduksiinissa olevan aktiivisen keskuksen avulla (Sordillo & Aitken 2009) (yhtälö 12). Sulfisillat pelkistyvät sytosolisen TRX reduktaasin avulla (Valko ym. 2006) (yhtälö 13). NaDPH toimii myös TRX:n takaisin pelkistysreaktioissa elektronin luovuttajana.

$$TRX\text{-}(SH)_2 + ROOH \rightarrow TRX\text{-}S_2 + ROH + H_2O \qquad (12)$$

$$TRX\text{-}S_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow{TRXr1} TRX\text{-}(SH)_2 + NADP^+ \qquad (13)$$

Thioreduksin reduktaasilla on myös muita tehtäviä solussa kuin hapettuneiden proteiinien pelkistäminen. Tumassa se säätelee transkriptiotekijöitä ja solun ulkopuolella se toimii yhdessä muiden kasvutekijöiden kanssa solun kasvun stimuloinnissa. Äskettäin tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että TRX:llä on hyvin keskeinen rooli myös seleeniä sisältämättömien antioksidanttisten entsyymien esiintymisessä, kuten hemioksygenaasin ekspressiossa (Trigona ym. 2006).

Seleeniä on rehuraaka-aineissa vaihtelevia määriä (Andrieu 2008). Esimerkiksi Suomen, Ruotsin, Tanskan, Norjan ja Iso-Britannian alueella maaperässä seleeniä on

puutteellisesti. Kasveissa seleeni on yleensä orgaanisessa muodossa eli aminohappoihin liittyneenä, kuten selenometioniinina tai selenokysteiininä. Eläimille voidaan antaa seleenipuutoksen ehkäisemiseksi myös epäorgaanista seleeniä, kuten selenaattia tai seleniittiä. Eläimillä vakava seleenin puutos voi aiheuttaa ruokintaperäistä lihasrappeumaa (Radostits ym. 2007).

Monissa tutkimuksissa on vertailtu orgaanisen seleenin lähteenä toimivan seleenihiivan ja epäorgaanisen natriumselenaatin hyväksikäyttöä (Knowles ym. 1999, Pehrson ym. 1999, Weiss & Hogan 2005, Guyot ym. 2007, Juniper ym. 2008, Ibeagha ym. 2009). Juniperin ym. (2008) kokeessa seleenihiiva lisäsi lihanaudoilla enemmän veren glutationiperoksidaasin aktiivisuutta kuin natriumselenaatti. Ibeaghan ym. (2009) tutkimuksessa vertailtiin orgaanisen ja epäorgaanisen seleenin vaikutusta neutrofiilien toimintaan. Kokeessa annettiin seleeniä kahdella eri tasolla: 0,3 tai 0,5 mg / kg ka. Tutkimuksessa havaittiin, että korkeammat rehun seleenipitoisuudet lisäsivät neutrofiilien oksidatiivisen purkauksen aktiivisuutta, mutta eivät vaikuttaneet neutrofiilien fagosytoimiseen. Orgaaninen seleeni vähensi neutrofiilien apoptoosia verrattuna epäorgaanista seleeniä saaneisiin. Weissin ja Hoganin (2005) tutkimuksessa seleenihiivan käyttö ei parantanut neutrofiilien bakteereiden tappokykyä tai nostanut fagosytoivien neutrofiilien osuutta kaikista neutrofiileistä. He selittävät tätä havaintoa sillä, että immuniteettiin liittyviin proteiineihin tarvitaan mahdollisesti seleeniä selenokysteiinin muodossa. Seleenihiivassa seleeni on pääasiassa selenometioniinin muodossa.

Seleenin vaikutuksia on tutkittu myös poikimisen tienoilla olevalla lypsylehmällä sekä naudalla ja sialla lihanlaatuun vaikuttavana tekijänä. Näitä tutkimuksia on käsitelty kappaleessa 4 ja 5.

3.5 Sinkki

Sinkki toimii elimistössä antioksidanttina syrjäyttämällä rauta-ioneja ja estäen siten raudasta johtuvaa hapettumista (Halliwell & Gutteridge 2007) Sinkki on myös osa superoksididismutaasientsyymiä (CuZnSOD), joka on hyvin tehokas superoksidin hävittäjä elimistössä (Halliwell & Gutteridge 2007). CuZnSOD:issa sinkki ei reagoi vapaiden radikaalien kanssa, vaan sen tehtävänä on pitää entsyymi kasassa reaktion aikana. Sinkin voi korvata entsyymissä koboltti, kadmium tai elohopea. CuZnSOD:ia

löytyy melkein kaikista soluista ja yleensä se sijaitsee solulimassa. Sitä on löydetty vähäisiä määriä myös lysosomeista, peroksisomeista, tumasta ja mitokondrioista.

Spearsin vuonna 2002 kirjoittamassa hivenaineiden vaikutuksia immuunipuolustukseen käsittelevässä katsauksessa todetaan, että marginaalinen sinkin puute märehtijöillä ei vaikuta vasta-aine tuotantoon tai lymfosyyttien erilaistumisjakautumiseen. Uusimmissa tutkimuksissa on vertailtu erilaisten sinkkiyhdisteiden vaikutusta immuniteettiin (Salyer ym. 2004, Mandal ym. 2007). Mandalin ym. (2007) tekemässä tutkimuksessa huomattiin, että sinkkipropionaatti paransi sonnien solu- ja vasta-ainevälitteistä immuuniteettiä sinkkisulfaattia paremmin. Salyer ym. (2004) huomasivat, että IgG-pitoisuus lisääntyi kuparisulfaattia saaneilla hiehoilla enemmän kuin sinkkisulfaattilisää saaneilla hiehoilla 14 ja 21 vrk rokotuksen jälkeen.

Sinkki vaikuttaa yhdessä biotiinin kanssa sorkan keratinisaatioon ja estää ontumista (Enjalbert ym. 2006, Wilde 2006). Ontuminen yleensä tapahtuu laktaatiokaudella, mutta sorkkaan kohdistuvien vaurioiden on epäilty tapahtuvan ennen poikimista. Laidunolosuhteissa sinkin ja muiden hivenaineiden lisäys ei tuonut sorkkiin lisää kestävyyttä (Griffiths ym. 2007). Enjalbert ym. (2006) havaitsivat että sinkin puutoksesta kärsivissä karjoissa oli enemmän ontuvia lehmiä. Tutkimuksen mukaan sinkin plasmakonsentraatio tulisi olla korkeampi kuin 14 μmol/l jotta sinkin puutoksesta johtuvia sairauksia ei esiintyisi.

Sinkin vaikutuksia eläinten terveyteen on tutkittu kokeissa, joissa on annettu useita eri hivenaineita sisältävää hivenainevalmistetta. Emolehmillä tehdyssä tutkimuksessa hivenainelisä, joka sisälsi sinkkiä, kuparia ja mangaania, paransi emolehmien hedelmällisyyttä ja lisäsi vieroitettujen vasikoiden määrää (Ahola ym. 2004).

3.6 Kupari

Kupari on paitsi voimakas pelkistäjä, mutta myös voimakas oksidatiivisten vaurioiden aiheuttaja (Halliwell & Gutteridge 2007). Sekä kuparin ylimäärä että puute voi aiheuttaa oksidatiivista stressiä. Kuparin antioksidanttinen vaikutus perustuu sen toimintaan katalyyttisenä koentsyyminä kuparisinkkisuperoksididismutaasissa (CuZnSOD) (Radostits ym. 2007). CuZnSOD:in toimintaa on käsitelty kappaleessa 3. Kupari on myös osa keruloplasmiini-makromolekyyliä, joka sitoo solunulkoisessa

nesteessä olevia metallisia katalyytteja estäen esimerkiksi Fentonin reaktion tapahtumista. Kupari toimii elimistössä myös muiden entsyymeiden, kuten sytokromioksidaasin osana (NRC 2001).

Kuparin puutteen ja punasolujen oksidatiivisen stressin yhteyttä on selvitetty kuparin puutteesta kärsivillä lampailla (Saleh ym. 2008). Kuparin puutteesta kärsivillä lampailla veren kuparitaso sekä punasolujen superoksidismutaasi-, katalaasi- ja glutationiperoksidaasipitoisuus olivat merkitsevästi alhaisempia kuin vertailuryhmässä olleilla, riittävästi kuparia saaneilla lampailla. Aholan ym. (2004) kaksivuotisessa tutkimuksessa vertailtiin orgaanisessa ja epäorgaanisessa muodossa olevien hivenaineiden kulkeutumista maksaan. Orgaaninen kupari kulkeutui nautojen maksaan paremmin kuin epäorgaaninen.

Kuparin vaikutusta hiehojen immuniteettiin on tutkittu (Sharma ym. 2005). Sharman ym. (2005) kokeessa luonnostaan kuparin puutteesta kärsiville hiehoille annettiin kuparisulfaattia ja niiden immuniteetin muuttumista seurattiin verinäytteistä eristettyjen neutrofiili- ja punasolunäytteiden avulla. Neutrofiilien fagosytoimiskyky *Candida albicans* –hiivaa vastaan parani merkitsevästi 60 vrk käsittelyn aloittamisen jälkeen. Punasolujen superoksididismutaasin aktiivisuus lisääntyi merkitsevästi jo 30 vrk lisän aloittamisesta.

4 OKSIDATIIVISEN STRESSIN JA ANTIOKSIDANTTIEN VAIKUTUKSET LYPSYLEHMILLÄ

Lypsylehmät ovat hyvin herkkiä sairauksille poikimisen tienoilla (Mulligan & Doherty 2008). Englanninkielisessä kirjallisuudessa poikimisen tienoilla olevaa lehmää kutsutaan erityisellä nimellä ”transition cow” eli muutosvaiheessa oleva lehmä (Grummer 1995). Muutosvaihe käsittää ajanjakson, joka alkaa noin kolme viikkoa ennen poikimista ja päättyy kolme viikkoa poikimisen jälkeen. Lypsylehmien immuunipuolustuksen on todettu heikkenevän tämän ajanjakson aikana voimakkaasti (Mulligan & Doherty 2008). Monissa tutkimuksissa immuunipuolustuksen heikkenemisen syynä pidetään oksidatiivista stressiä (Miller ym. 1993, Sordillo 2005, Spears & Weiss 2008), joka on peräisin aineenvaihdunnan muuttumisesta lisääntyneen hapen kulutuksen takia (Sordillo & Aitken 2009). Immuunipuolustuksen heikkenemistä

pahentaa kalsiumin (Ducusin ym. 2003, Kimura ym. 2006) ja energian (Ohtsuka ym. 2006) puute sekä kortisonin lisääntyneet pitoisuudet (Burton ym. 2005). On myös havaittu, että korkea kuntoluokka voi lisätä oksidatiivistä stressiä ja vaikuttaa sairastumiseen (Bernabucci ym. 2005, O'Boyle ym. 2006).

Lypsylehmillä poikimisen tienoilla esiintyviä tauteja ovat mm. jälkeisten jääminen (Kankofer 2002), utaretulehdus (Sordillo 2005) ja kohtutulehdukset (LeBlanc 2008). Näiden tautien on todettu olevan yhteydessä oksidatiiviseen stressiin ja altistavan myöhemmin lypsykaudella huonontuneelle hedelmällisyydelle (Wilde 2006, LeBlanc 2008). Poikimisen tienoilla olevan lehmän terveyttä edistävinä aineina on eniten tutkittu E-vitamiinia ja seleeniä (Wilde 2006, Spears & Weiss 2008). Näitä aineita on annettu tutkimuksissa pistoksena lihaksen sisäisesti (Paula-Lopes ym. 2003, Gupta ym. 2005, Bourne ym. 2008) tai nahan alaisesti (LeBlanc ym. 2002) tai suun kautta väkirehuihin sekoitettuna (Smith ym. 1984, Baldi ym. 2000, Persson-Waller ym. 2007).

4.1 Utaretulehdus

Utaretulehduksessa tapahtuvan kudosvaurion on esitetty johtuvan osittain neutrofiilien oksidatiivisessa purkauksessa vapauttamien vapaiden radikaalien aiheuttamasta oksidatiivisistä vaurioista (Lauzon ym. 2005, Zhao & Lacasse 2008). Lauzonin ym. (2005) *In vitro* -kokeessa naudan neutrofiilien todettiin aiheuttavan naudan maitorauhasen epiteelille vakavaa vahinkoa. Kun aktivoituja neutrofiilejä ja maitorauhasen epiteelikudosta sisältävään soluviljelmään lisättiin antioksidantteina toimivia aineita, vahingot saatiin estettyä osittain tai kokonaan.

E-vitamiinia on tutkittu utaretulehduksen ehkäisyssä yli parin kymmenen vuoden ajan (Smith ym. 1984, Moyo ym. 2005, Neelesh 2007, Heinrichs ym. 2009). Yksi varhaisimmista ja eniten viitatuimmista kokeista on Smith ym. (1984). Tässä kokeessa tutkittiin suun kautta annetun E-vitamiinin ja seleenin vaikutusta kliinisen utaretulehduksen esiintymiseen ja kestoon. E-vitamiinin havaittiin vähentävän kliinisen utaretulehduksen esiintymistä 37 %. Seleenin havaittiin vähentävän kliinisen utaretulehduksen oireiden kestoa 46 %. Moyo ym. (2005) julkaisivat vuosina 1983–2003 tehdyistä utaretulehdusta käsittelevistä E-vitamiinitutkimuksista meta-analyysin. Meta-analyysissä oli mukana yhteensä 34 tutkimusta, josta 14 hyväksyttiin tilastolliseen

testaukseen. Näiden tutkimusten perusteella E-vitamiinilisä lypsylehmillä vähensi utaretulehdusriskiä 14 % ja kliinisen utaretulehduksen esiintyvyyttä 30 %.

Suomalaisessa kenttäkokeessa utaretulehduksen ilmaantuvuus (insidenssi) ei ollut yhteydessä seerumin E-vitamiini- tai β-karoteenipitoisuuksien kanssa (Jukola 1994). Tutkimuksessa oli mukana 16 karjaa. Jukolan (1994) tekemässä tutkimuksessa koko veren seleenipitoisuuden lisääntyminen oli yhteydessä *S. aureus*, *A. pyogenes* ja *Corynebakterium* –bakteereiden aiheuttamien utaretulehduksien vähentymiseen. Jukolan (1994) mukaan koko veren seleenipitoisuuden pitäisi olla noin 200 μg/l, jotta sillä olisi vaikutusta utareterveyteen. Tutkimuksessa ei löydetty yhteyttä veren glutationiperoksidaasin ja kliinisen utaretulehduksen välille.

Bournen ym. (2008) tutkimuksessa annettiin lehmille kaksi 2100 mg:n DL-α-tokoferoliasetaattiannosta lihaksen sisäisenä pistoksena 2 viikkoa ennen poikimista ja poikimispäivänä. Annoksessa oli E-vitamiinin lisäksi 7 g natriumselenaattia. Pistoksen saaneilla lehmillä oli vähemmän utaretulehdushoitoja kuin vertailuryhmällä, joka ei saanut pistosta. Erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. LeBlanc ym. (2002) eivät saaneet merkitseviä eroja esille utaretulehduksen esiintymisessä tutkimuksessa, jossa annettiin lumelääkettä tai 3000 k.y:n kerta-annos RRR-α-tokoferolia pistoksena nahan alle viikko ennen poikimista. Persson-Wallerin ym. (2007) kokeessa ei havaittu dieetin mukana annetun 1610 mg:n RRR-α-tokoferolilisän vaikuttavan utaretulehduksen esiintyvyyteen. Lisää alettiin antaa neljä viikkoa ennen poikimista ja antamista jatkettiin kaksi viikkoa poikimisen jälkeen. Perssonin ym. (2007) ja LeBlancin ym. (2002) tutkimukset olivat kenttäkokeita, jotka toteutettiin useilla yksityistiloilla.

Kuparin vaikutusta on tutkittu utaretulehduksen esiintymiseen hiehoilla (Scaletti ym. 2003). Scaletin ym. (2003) tutkimuksessa kupari vähensi *E. coli* -bakteerin aiheuttamaa utaretulehduksen vakavuutta hiehoilla. Hiehoilla, jotka saivat 20 ppm kuparia oli vähemmän kliinistä utaretulehdusta kuin hiehoryhmällä, joka sai dieetistä 6.5 ppm kuparia. Kuparin suuremmalla saannilla ei ollut merkitystä utaretulehduksen kestoon. Hivenaineiden, kuten kuparin ja sinkin puutteen on esitetty vaikuttavan utareessa sekä keratiinitulpan syntymiseen että fagosyyttien saapumiseen infektiopaikalle (Heinrichs ym. 2009).

4.2 Jälkeisten jäänti, kohdun tulehdukset ja hedelmällisyys

Jos lehmä ei tee jälkeisiä 24 tunnin sisällä vasikan syntymisestä, sitä kutsutaan jälkeisten jäämiseksi (Bourne ym. 2007). Jälkeisten jääminen heikentää hedelmällisyyttä, koska jälkeisten jääminen aiheuttaa helposti tulehduksia kohtuun. Jälkeisten jäämisen on esitetty johtuvan neutrofiilien toiminnan häiriintymisestä (Kimura ym. 2002). Poikimisen jälkeen elimistön pitää tunnistaa jälkeiset vieraaksi kudokseksi. Tämä tapahtuu neutrofiilien avulla. Kimuran ym. (2002) kokeessa vertailtiin terveiden ja jälkeisten jäämisestä kärsivien lehmien verestä eristettyjen neutrofiilien toimintakykyä sikiökalvoista valmistetussa valmisteessa. Lehmillä, joilla jälkeiset olivat jääneet, oli neutrofiilien toiminta ennen poikimista ja 1-2 viikkoa poikimisen jälkeen tilastollisesti merkitsevästi alhaisempaa kuin terveillä lehmillä. Lypsylehmän neutrofiilien toiminnan on todettu olevan erilaista poikimisen jälkeen kuin lypsykauden puolivälissä (Rinaldi ym. 2008).

E-vitamiinia on tutkittu jälkeisten jäännin yhteydessä (Bourne ym. 2008). Bournen ym. (2008) tutkimuksessa annettiin lehmille kaksi 2100 mg:n E-vitamiiniannosta lihaksen sisäisenä pistoksena 2 viikkoa ennen poikimista ja poikimispäivänä. Annoksessa oli E-vitamiinin lisäksi 7 g natriumselenaattia. Pistoksen saaneilla lehmillä oli vähemmän jälkeisten jääntiä ja tulehduksia kohdussa kuin vertailuryhmällä, joka ei saanut pistosta. Erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Jälkeisten jäänti väheni pistoksen saaneilla 3 %:iin, kun vertailuryhmällä esiintyvyys oli 6,5% (p=0.055). LeBlanc ym. (2002) eivät saaneet merkitseviä eroja esille jälkeisten jäännin tai kohdun tulehdusten esiintymisessä antamalla lumelääkettä tai 3000 k.y:n kerta-annoksen E-vitamiinia pistoksena nahan alle viikko ennen poikimista. Guptan ym. (2005) tutkimuksessa ennen poikimista annettu lihaksen sisäinen E-vitamiinia 1100 k.y:ä ja 30 mg natriumseleenaattia sisältävä pistos ei vaikuttanut jälkeisten jäännin esiintymiseen.

Bourne ym. (2007) kokosivat meta-analyysin jälkeisten jääntiä koskevista E-vitamiinitutkimuksista. Analyysissä oli mukana 44 vuoden 1972 jälkeen julkaistua tutkimusta. E-vitamiini vähensi jälkeisten jäännin esiintymistä 20 tutkimuksessa ja 21 tutkimuksessa ei vaikutusta havaittu. Kolmessa tutkimuksessa E-vitamiinilisää saaneilla lehmillä oli todettu jälkeisten jäännin esiintymisen lisääntyneen. Tilastollisen käsittelyn jälkeen lopullinen päätelmä oli, että ummessa oloajan E-vitamiinilisä on yhteydessä jälkeisten jäännin vähentymiseen. Lisäksi synteettiset asetaattimuotoiset tokoferolit

olivat tehokkaampia jälkeisten jäännin vähentämisessä kuin luonnollinen alkoholimuotoinen α-tokoferoli. Tutkijoiden mukaan selityksenä saattoi olla alkoholimuotoisen E-vitamiinin huonompi säilyvyys varasto-olosuhteissa verrattuna asetaattimuotoisiin E-vitamiineihin. Tuloksiin vaikutti myös se, että monissa mukana olleissa tutkimuksissa oli annettu E-vitamiinin lisäksi myös seleenilisää.

Jukolan (1994) tutkimuksessa veren E-vitamiini- ja β-karoteenipitoisuus ei ollut yhteydessä hedelmällisyyshäiriöihin tai hedelmällisyyteen. Tässä tutkimuksessa veren glutationiperoksidaasipitoisuus ei ollut yhteydessä hedelmällisyyshoitoihin. Lehmillä kuparia, sinkkiä, mangaania ja kobolttia sisältävä hivenainelisä ei ole parantanut tilastollisesti merkitsevästi hedelmällisyyttä (Griffiths ym. 2007). Uudessa-Seelannissa tehdyssä tutkimuksessa edellä mainittujen hivenaineiden lisäys laitumella olleille lehmille 35 vrk ennen poikimista – 230 vrk poikimisen jälkeen vähensi melkein merkitsevästi tyhjäksi jääneiden lehmien määrää ($p=$ tai <0.10).

Paula-Lopeksen ym. (2003) tutkimuksessa annettiin neljä lihaksen sisäistä injektiota, jotka sisälsivät 500 mg:n E-vitamiinia sekä 50 mg seleeniä 8 ja 21 päivää ennen poikimista sekä 30 ja 80 päivää poikimisen jälkeen. Pistoksilla ei havaittu olevan vaikutusta lehmien hedelmällisyyteen. Persson-Wallerin ym. (2007) tutkimuksessa 1 610 mg:n RRR-α-tokoferolilisä ei vaikuttanut hedelmällisyyteen. Baldin ym. (2000) tutkimuksessa korkeampaa (2 000 k.y. / pv vs. 1 000 k.y. / pv) E-vitamiinilisää saaneet lehmät tulivat tiineeksi nopeammin ja vähemmillä siemennyskerroilla kuin alhaisempaa E-vitamiinilisää saaneet lehmät.

Uusimmissa tutkimuksissa on havaittu, että vapaat radikaalit voivat olla sekä haitallisia että hyödyllisiä lisääntymiseen liittyvissä fysiologisissa toiminnoissa (Roy ym. 2008). Matala ROS-pitoisuus voi olla edullista silloin, kun siittiö kiinnittyy munasolun pintaan. Naudoilla superoksidianioni ($^{\bullet}O_2^-$) ja vetyperoksidi ovat olennaisia sperman kapasitaatiolle ja akrosomireaktiolle *in vitro*. Toisaalta on myös havaittu, että lisääntynyt vetyperoksidipitoisuus vähentää naudan sperman liikkuvuutta *in vitro* ja voi heikentää myös hedelmöittymistä ja alkion kehittymistä. Viime aikaisissa nautojen hedelmällisyystutkimuksissa on tutkimuksissa onkin tutkittu antioksidanttisten entsyymien, kuten superoksidismutaasin, glutationiperoksidaasin ja katalaasin esiintymistä lehmien lisääntymiselimissä eri kiimakierron vaiheissa (Lapointe & Bilodeau 2003, Roy ym. 2008). Näiden tutkimusten mukaan antioksidanttisten

entsyymien pitoisuudet vaihtelevat munanjohtimessa kiimakierron eri vaiheissa, millä voi olla hyvin tärkeä rooli sperman säilymisessä ja kapasitaatiossa.

5 OKSIDATIIVISEN STRESSIN JA ANTIOKSIDANTTIEN VAIKUTUKSET LIHAN JA MAIDON LAATUUN

5.1 Vaikutukset lihan laatuun

Vedensidontakyky ja rasvojen härskiintyminen ovat lihan laatuun vaikuttavia tekijöitä. Vedensidontakyky, josta englanninkielisessä kirjallisuudessa käytetään nimitystä ”drip loss”, tarkoittaa jäähdytetyn ja keittämättömän lihan kykyä pidättää vettä (Lawrie & Ledward 2006). Vedensidontakykyyn vaikuttaa mm. lihan pH ja erityisesti pH:n muuttumisnopeus teurastuksen jälkeen. Vedensidontakyvyssä myös laji- ja ikäkohtaisia eroja. Rasvojen hapettuminen eli härskiintyminen on tärkein tekijä, joka vaikuttaa lihan pilaantumiseen ja moniin muihin lihan ominaisuuksiin, kuten tuoksuun, väriin, rakenteeseen sekä ravintoarvolliseen laatuun (Buckley ym. 1995). Lihan väri johtuu suurimmaksi osaksi myoglobiinista ja sen sisältämästä raudasta (Lawrie & Ledward 2006). Myoglobiini on proteiini, joka voi edistää vapaiden radikaalien, kuten superoksidianioinin ja ferroraudan tuottoa, jos se joutuu tekemisiin vetyperoksidin kanssa (Halliwell & Gutteridge 2007).

5.1.1 Märehtijät

Schmidt ja Olson (2007) ovat koonneet katsauksessaan hivenaineiden ja E-vitamiinin vaikutuksia naudanlihan laatuun. Heidän mukaansa yli NRC:n suosittelemien tasojen olevasta sinkki, kupari ja seleeniruokinnasta ei ole vaikutusta ruhojen tai naudanlihan laatuun (Schmidt & Olson 2007). Heidän havaintonsa mukaan myöskään E-vitamiinilisällä ei ole vaikutusta ruhojen laatuun, mutta E-vitamiini lisää α-tokoferolipitoisuutta lihaksessa ja vaikuttaa sitä kautta rasvojen, solukalvon rasvahappojen ja myoglobiinin hapettumiseen ja lihan säilyvyyteen. E-vitamiini vaikuttaa myös lihan värin säilyvyyteen viivästyttämällä myoglobiinin hapettumista (Phillips ym. 2001). Lisääntynyt rasvojen härskiintyminen väkirehuruokituilla naudoilla on yhteydessä monityydyttymättömien rasvahappojen suureen suhteelliseen osuuteen ja vähäiseen E-vitamiinipitoisuuteen (Warren ym. 2008). Korkeiden dieetin E-

vitamiinitasojen on havaittu olevan yhteydessä korkeampaan monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuuteen lihaksessa lampailla (Demirel ym. 2004). Woodin ym. (2008) katsauksessa todetaan E-vitamiinin olevan keskeinen tekijä märehtijöillä monityydyttymättömien rasvahappojen stabilisoimisessa. Dunshea ym. (2005) esittävät katsauksessaan, että naudoilla E-vitamiinilisällä voi olla suurempi vaikutus lihan värin säilyvyyteen kuin sioilla, koska naudan liha sisältää enemmän myoglobiinia. E-vitamiinilisän on todettu parantavan naudanlihan vedensidontakykyä (Mitsumoto ym. 1998). E-vitamiinilisän vaikutus naudanlihan vedensidontakykyyn on erilainen eri lihaksissa (Den Hertog-Meischke ym. 1997).

Laidunruohosta saatavilla karotenoideilla on todettu olevan vaikutusta naudan nahanalaisen rasvan väriin (Dunne ym. 2009). Laidunruokinnalla olleiden nautojen rasva on kellertävämpää verrattuna viljaruokinnalla olleiden nautojen rasvaan. Kuluttajat pitävät keltaista väriä yleensä epämiellyttävänä, mutta uusin tutkimus ehdottaa, että lihassa olevan rasvan keltaisuus voi olla merkki ihmisille terveellisemmästä rasvahappokoostumuksesta ja lisääntyneestä antioksidanttipitoisuudesta. Raiheinällä ja säilörehulla ruokittujen nautojen rasvan on todettu olevan kellertävämpää (Kerth ym. 2007, Walsh ym. 2008) ja sisältävän enemmän monityydyttymättömiä rasvahappoja ja antioksidanttisia vitamiineja (askorbiinihappoa, α-tokoferolia ja β-karoteenia) kuin viljalla ruokittujen (Descalzo ym. 2005, Insani ym. 2008). Lampailla laitumeen perustuva dieetti vähensi *M. longisimus dorsi* -lihaksesta mitattujen rasvojen härskiintymistä verrattuna väkirehudieettiin (Santé-Lhoutellier ym. 2008).

β-karoteeni voi lisätä myös naudanlihan punaisen värin säilyvyyttä (Muramoto ym. 2003). Muramoton ym. (2003) kokeessa β-karoteenilisä (7 500 mg /päivä/eläin) lihanautojen ruokinnassa lisäsi naudan lihan punaisen värin säilyvyyttä puolitoista tai kolme vuorokautta riippuen näytteeksi otetusta lihaksesta (*M. semibranosum* tai *M. longisimus lumborum*). Myös tanniinien on todettu lisäävän lihan punaisen värin säilyvyyttä (Luciano ym. 2009). Lucianon ym. (2009) tutkimuksessa lampaiden ruokintaan lisätty tanniini ei vaikuttanut rasvojen härskiintymiseen lihassa.

Myös muita hivenaineita on tutkittu lihanlaatuun vaikuttavana tekijänä (Engle & Spears 2000, Kessler ym. 2003). Naudoilla kuparilisä (10 tai 20 mg / kg väkirehua) lisäsi tyydyttymättömien rasvahappojen määrää *M. logisimus* –lihaksessa (Engle & Spears

2000). Vuohilla kuparin on todettu vaikuttavan lihan ja rasvakudoksen rasvahappokoostumukseen ja lihaksen rasvojen härskiintymiseen (Cummins ym. 2008). Cumminsin ym. (2008) tekemässä tutkimuksessa suun kautta annettu kuparilisä lisäsi merkitsevästi C14:0 ja C16:0 rasvahappojen määrää rasvakudoksessa. Lihaksessa C15:0 lisääntyi merkitsevästi (P=0.03). Kupari ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi lihaksen tai rasvakudoksen rasvojen härskiintymiseen. Sinkillä ei ole todettu olevan vaikutusta naudan lihan ruhojen tai lihanlaatuun (Kessler ym. 2003).

5.1.2 Siat

E-vitamiinin vaikutuksia sianlihan vedensidontakykyyn, lihan väriin, rasvojen härskiintymiseen ja säilyvyyteen on tutkittu runsaasti 90-luvun lopussa ja 2000-luvun alussa (Jensen ym. 1997, Houben ym. 1998, Phillips ym. 2001, Hasty ym. 2002) ja aiheesta on julkaistu useita katsauksia (Buckley ym. 1995, Jensen ym. 1998, Dunshea ym. 2005). Sikojen ruokintatutkimuksissa 2000-luvun loppupuolella on kokeiltu erilaisten rasvalisien käyttöä yhdistettynä erilaisiin antioksidanttiruokintoihin. Lisäämällä sikojen ruokintaan esimerkiksi konjukoitua linolihappoa (CLA) (Morel ym. 2008) tai soijaöljyä (Eder ym. 2005) on haluttu muuttaa sianlihan rasvahappokoostumusta (Dunshea ym. 2005) tai lisätä rehun energiapitoisuutta (Guo ym. 2006a). Tyydyttymättömien rasvahappojen lisääminen ruokintaan kuitenkin lisää myös rasvojen härskiintymisen tapahtumista (Buckley ym. 1995).

Buckley ym. (1995) katsauksessa todetaan yli suositeltujen ravintoainetarvetasojen olevan E-vitamiiniruokinnan olevan tehokas keino estää rasvojen härskiintymistä. Dunshea ym. (2005) ovat koonneet katsausartikkelissaan edellisinä vuosina tehtyjä E-vitamiinitutkimuksia. Dunshean ym. (2005) mukaan riittävä E-vitamiinitaso, jolla vaikutetaan lihan vedensidontakykyyn, väriin ja rasvojen härskiintymiseen, on 200 mg all-rac-α-tokoferoliasetaattia / kg rehua. Tätä E-vitamiinilisän tasoa rehuassa tulisi jatkaa 84–130 päivää ennen teurastusta. Korkeammat E-vitamiinitasot (700–800 mg all-rac-α-tokoferoliasetaattia) vähentävät rasvojen härskiintymistä, mutta niillä on vain vähäinen vaikutus lihan väriin ja vedensidontakykyyn. Dunshean ym. (2005) katsaukseen kuuluneista artikkeleista kahdessa artikkelissa oli tutkittu vedensidontakykyä. E-vitamiinilisä vähensi vedensidontakykyä toisessa tutkimuksessa 40 % ja toisessa tutkimuksessa E-vitamiinilisällä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta. Viidessä tutkimuksissa rasvojen härskiintyminen väheni 68–80 % ja lihan

punaisuus lisääntyi 33–106 %. Yhdessä tutkimuksessa E-vitamiinilla ei ollut vaikutusta lihan väriin.

Viime vuosina antioksidanttilisien vaikutusta sikojen lihan laatuun ovat tutkineet mm. Guo ym. (2006a), Guo ym. (2006b), Gebert ym. (2006), Mateo ym. (2007), Hasty ym. (2002) ja Zhan ym. (2007). Guon ym. (2006a) tutkimuksessa E-vitamiinilisän nousu 40 mg:sta 200 ja 400 mg:aan lisäsi tilastollisesti merkitsevästi vedensidontakykyä. Samassa kokeessa tutkittiin myös E-vitamiinilisän keston vaikutusta lihanlaatuun. E-vitamiinilisän tason ja keston lisääminen vaikutti vedensidontakykyyn ja vähensi rasvojen härskiintymistä. Rasvojen härskiintyminen vähentyi myös Guon ym. (2006b) kokeessa korkeampaa E-vitamiinilisää (40 k.y. vs. 200 k.y.) saaneiden sikojen lihassa. Gebertin ym. (2006) tutkimuksessa yhtäaikaa annettu E- ja C-vitamiinilisä ei vaikuttanut rasvojen härskiintymiseen tai vedensidontakykyyn. Hastyn ym. (2002) kokeessa E-vitamiinilisällä ei ollut vaikutusta vedensidontakykyyn eikä lihan punaisuuteen. Mateon ym. (2007) tutkimuksessa orgaaninen seleenilisä lisäsi lihan vedensidontakykyä tilastollisesti merkitsevästi. Orgaaninen seleeni lisäsi myös seleenipitoisuutta lihaksessa, maksassa ja seerumissa. Zhanin ym. (2007) kokeessa selenometioniini lisäsi lihan punaisen värin säilyvyyttä paremmin kuin natriumseleniitti.

5.2 Vaikutukset maidon ja ternimaidon laatuun

Rehun mukana annetuilla antioksidanteilla on todettu olevan vaikutusta maidon rasvapitoisuuteen (Liu ym. 2008), rasvahappokoostumukseen (Liu ym. 2008) ja maidon sisältämien antioksidanttien määrään (Meglia ym. 2006, Calderon ym. 2007a, Weiss ym. 2009). Eniten tutkituimpia antioksidantteja ovat E-vitamiini, seleeni ja karotenoidit. Maitomäärään antioksidanttien ei ole havaittu vaikuttavan (Baldi ym. 2000, Liu ym. 2008).

5.2.1 Rasvapitoisuus ja rasvahappokoostumus

E-vitamiinilisällä on todettu olevan maidon rasvapitoisuutta lisäävä vaikutus (Liu ym. 2008). Liun ym. (2008) tekemässä kokeessa E-vitamiinilisä (DL-α-tokoferoliasetaatti 10 000 k.y.) lisäsi maidon rasvapitoisuutta 15,1 % verrattuna pelkällä perusdieetillä olleisiin lehmiin. E-vitamiinilisä yhdistettynä seleenilisään (0.3 mg / kg ka) lisäsi maidon rasvapitoisuutta 16,6 % verrattuna pelkällä perusdieetillä olleisiin lehmiin.

Perusdieetti sisälsi tässä kokeessa E-vitamiinia 4000 k.y. ja A-vitamiinia 800 000 k.y. ja seleeniä 0.06 g / kg ka. E-vitamiini voi lisätä myös rasvan määrää (Pottier ym. 2006). Pottierin ym. (2006) kokeessa lehmille korkean rasvalisän yhteydessä annettu E-vitamiinilisä (12 000 k.y. / vrk) kasvatti maidon rasvamäärää yli 17 %.

Liun ym. 2008 tekemässä tutkimuksessa seleenilisä (0.3 mg / kg ka) yksistään ja yhdistettynä E-vitamiinilisään (10 000 k.y.) vaikutti maidon rasvahappokoostumukseen. Yhdistetty seleeni- ja E-vitamiinilisä vähensi tyydyttyneiden rasvahappojen (saturated fatty acid, SFA) määrää maidossa 7.1 % verrattuna perusdieettiä saaneisiin. Tyydyttymättömien rasvahappojen (unsaturated fatty acid, UFA) määrä nousi samalla 4.6 %. Kayn ym. (2005) tutkimuksessa E-vitamiinilisä (DL-α-tokoferoliasetaattia 10 000 k.y) ei vaikuttanut maidon rasvahappokoostumukseen.

Konjukoitu linolihappo (conjugated linoleic asid, CLA) on tyydyttymättömiin rasvahappoihin kuuluva rasvahappo, joka on herättänyt paljon mielenkiintoa ihmisten terveyteen liittyvien myönteisten vaikutustensa vuoksi (Kay ym. 2005, Liu ym. 2008). Konjukoitu linolihappo on pötsin biohydrogenaation tuloksena syntyvä tuote, jota on kahta muotoa, *cis-9, trans-11* CLA ja *cis-12, trans-10* CLA (Kay ym. 2005). Näistä ensimmäistä pidetään ihmisille terveellisempänä. Liun ym. (2008) kokeessa yhdistetyn E-vitamiini (10 000 k.y.) ja seleenilisän (0.3 mg/kg ka) havaittiin lisäävän myös *cis-9, trans-11* CLA:n määrää maidossa. *cis-12, trans-10* CLA:n määrään E-vitamiinilla tai seleenillä ei havaittu olevan vaikutusta. Kayn ym. (2005) tutkimuksessa seosrehuruokituilla lehmillä E-vitamiinilisä (DL-α-tokoferoliasetaattia 10 000 k.y.) ei vaikuttanut merkitsevästi maidon rasvahappokoostumukseen.

5.2.2 Antioksidanttien erittyminen maitoon

Eri isomeerien vaikutusta α-tokoferolin erittymiseen maitoon on tutkinut mm. Weiss ym. (2009). Tässä tutkimuksessa lehmille annettiin 2500 k.y. joko all-rac-α-tokoferolia tai RRR-α-tokoferolia. α-tokoferolin pitoisuudet olivat suurimmat RRR-α-tokoferolia saaneilla lehmillä sekä ternimaidossa että normaalimaidossa. Ternimaidossa α-tokoferolipitoisuudet ovat suurempia kuin normaalimaidossa (Meglia ym. 2006). Meglian ym. (2006) tutkimuksessa havaittiin, että maidossa esiintyy suhteellisesti eniten (yli 86 %) RRR-α-tokoferolia riippumatta siitä, missä muodossa lehmä on saanut α-

tokoferolia. Kokeessa verrattiin all-rac-α-tokoferoliasetaattin, RRR-α-tokoferoliasetaattin ja RRR-α-tokoferolin kulkeutumista maitoon.

Seleenilisä nostaa maidon seleenikonsentraatiota (Liu ym. 2008). Liun ym. (2008) kokeessa seleenitaso 0.3 mg / kg ka vs. 0.15 mg / kg ka nosti maidon seleenitasoa merkitsevästi. Samassa kokeessa verrattiin erilaisien E-vitamiinitasojen vaikutusta maidon E-vitamiinin määrään. E-vitamiinin määrä maidossa oli merkitsevästi ($p<0.05$) korkeampi eläinten saadessa 10 000 k.y. / vrk E-vitamiinia kuin eläinten saadessa 5 000 k.y. / vrk tai 4 000 k.y. / kg rehua (pelkän perusdieetin E-vitamiinitaso). Seleenilisä ei vaikuttanut E-vitamiinin eikä E-vitamiinilisä seleenin määrään maidossa. Seleenin antomuodolla on vaikutusta maidon seleenipitoisuuteen (Givens ym. 2004, Ceballos ym. 2009). Seleenihiiva lisää enemmän maidon seleenipitoisuutta kuin natriumselenaatti (Ceballos ym. 2009).

Maidon karoteenipitoisuus on maidon ulkonäköön vaikuttava tekijä. Karoteenit aiheuttavat maitoon kellertävän värin (Agabriel ym. 2007). Laidunruohoa syöneiden eläinten maidossa on todettu olevan kellertävämpää ja sisältävän enemmän β-karoteenia, E-vitamiinia ja luteiinia, joka myös kuluu karotenoideihin. Karotenoidien erityksen maitoon on todettu riippuvan lehmien tuotosvaiheesta (Calderon ym. 2007a). Calderonin ym. (2007a) tekemässä tutkimuksessa lehmien karoteenitasot laskivat jyrkästi poikimista seuraavan viikon aikana. Tässä kokeessa tutkittiin myös runsaasti karotenoideja sisältävän ja niukasti karotenoideja sisältävän ummessa oloajan ruokinnan vaikutusta maidon karoteiinipitoisuuksiin. Runsaasti karotenoideja sisältävää rehua saaneiden lehmien ternimaidossa oli β-karoteenipitoisuus merkitsevästi ($p<0.001$) suurempi kuin niukasti karotenoideja saaneiden lehmien ternimaidossa. Erot tasoittuivat ryhmien välillä kymmenen päivän kuluessa poikimisesta. Maidon β-karoteenipitoisuudet seuraavat dieetin muuttuneita ß-karoteenipitoisuuksia matalilla rehun ß-karoteenipitoisuuksilla (Calderon ym. 2007b). Calderonin ym. (2007b) tutkimuksessa kuuden viikon koejakson jälkeen lehmien maidon β-karoteenipitoisuus oli suoraan verrannollinen siihen β-karoteeniin määrään mitä ne saivat rehussa. Karotenoidien pitoisuuden ylittäessä plasmassa 5 μg/ml maidon karoteiinipitoisuus ei enää noussut, mikä saattoi heijastaa β-karoteenin saturaatiota maidossa korkeilla karotenoidiruokinnoilla.

5.2.3 Antioksidanttien vaikutus somaattisten solujen määrään ja ternimaidon vasta-ainepitoisuuksiin

Somaattisten solujen määrä on keskeinen maidon laatu mittari. E- ja C-vitamiinin on todettu vaikuttavan somaattisten solujen määrään maidossa (Baldi ym. 2000, Weiss & Hogan 2007). Baldin ym. (2000) tutkimuksessa maidon somaattisten solujen määrä oli alhaisempi korkeampaa E-vitamiinilisää saavilla lehmillä kuin alhaisempaa lisää saavilla (2 000 k.y. / vrk vs. 1 000 k.y. / vrk). Weissin ja Hoganin (2007) tutkimuksessa lehmät saivat fosforyloitua askorbiinihappoa 30 mg / vrk ajanjaksolla, joka alkoi kaksi viikkoa ennen poikimista ja kesti viikon poikimisen jälkeen. Tutkimuksessa utaretulehdus aiheutettiin utareeseen keinotekoisesti lipopolysakkaridi-infuusiolla. Tässä yhteydessä C-vitamiinilisä vähensi somaattisten solujen määrää maidossa.

Lehmän maidosta ja ternimaidosta löytyviä antioksidanttisia aineita on tutkittu paljon (Liu ym. 2007, Przybylska ym. 2007, Kankofer & Lipko-Przybylska 2008, Wang ym. 2008, Stelwagen ym. 2009). Boland ym. (2009) ovat selvittäneet korkeiden hivenaine- ja E-vitamiinilisän vaikutusta immunoglobuliini G:n (IgG) määrään lampaiden ternimaidossa ja imeytymiseen karitsoiden suolesta. Lisä sisälsi 6,5 g kalsiumia, 4,9 g fosforia, 5,9 g magnesiumia, 4,0 g natriumia, 790 mg sinkkiä, 3,5 mg seleeniä, 40 mg jodia, 200 mg mangaania, 20 mg kobolttia ja 40 k.y:ä E-vitamiinia (Boland ym. 2005). Tutkimuksessa lisällä ei ollut vaikutusta ternimaidon määrään tai vasta-ainepitoisuuteen. Sen sijaan emän hivenaine- ja E-vitamiinilisän saaminen vähensi karitsan suolesta verenkiertoon imeytyvään IgG:n määrää. Seerumin IgG-pitoisuus oli lisää saaneiden uuhien karitsoilla tilastollisesti merkitsevästi ($p<0.001$) alhaisempi kuin lisää saamattomien uuhien karitsoilla. Näiden karitsoiden ulosteen koostumus oli myös erilainen. Tutkijoiden mukaan tämä saattoi johtua siitä, että hivenainelisä oli vaikuttanut sikiöaikana karitsoiden ruuansulatuskanavan kehittymiseen. Toisessa lammastutkimuksessa uuhien korkean seleenitason (81,8 vs. 9,5 µg / elopaino kg) ei havaittu vaikuttavan ternimaidon IgG-pitoisuuteen tai maidon kokonais IgG:n määrään (Swanson ym. 2008). Emakoilla ja porsailla tehdyssä tutkimuksessa E- ja C-vitamiinin yhtä aikainen anto emakoille tiineysaikana on lisännyt porsaiden kokonaisimmunoglobuliinien ja IgG:n määrää plasmassa (Pinelli-Saavedra ym. 2008).

6 ANTIOKSIDANTTIEN TUTKIMUSMENETELMÄT

6.1 Antioksidanttien ja oksidatiivisen stressin merkkiaineet ja määritysmenetelmät

Antioksidanttien toimintaa voidaan määrittää mittaamalla suorasti tai epäsuorasti antioksidantteja tai antioksidanttien puutteesta syntyneitä oksidatiivisia vaurioita (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Antioksidantteja voidaan mitata joko arvioimalla kokonaisantioksidanttikapasiteettia tai mittaamalla yksittäisiä antioksidantteina toimivia aineita. Kokanaiskapasiteettia mittaaviin menetelmiin kuuluvat kokonaisantioksidanttistatus eli TAS (total antioxidant status), Troloxin ekvivalentti kokonaisantioksidanttikapasiteetti eli TEAC (Trolox equivalent antioxidant capasity), radikaalien kanssa reagoiva antioksidanttiparametri eli TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) ja ferro (Fe^{3+})-rautaa pelkistävä antioksidanttivoima-analyysi eli FRAP (ferric reducing-antioxidant power). Nämä menetelmät kuvaavat yhdellä luvulla kaikkien antioksidanttien aktiivisuutta. Monet näistä menetelmistä ovat saatavilla kaupallisina valmisteina.

Yksittäisiä antioksidantteja mitataan nestekromatokrafia-analyyseilla (high-performance liquid chromatography, HPLC) (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Analyyseihin voidaan liittää esimerkiksi spektrofotometrinen glutationin disulfidisiltojen tai askorbaatti-dehydroaskorbaattitason määritys. Glutationi ja askorbaatti ovat kaksi tärkeintä oksidatiivisen stressin merkkiainetta, koska ne voivat pelkistää muita antioksidantteja toimivaan muotoon. Glutationin ja askorbaatin pitoisuus voi heijastaa myös muiden antioksidanttien, kuten E-vitamiinin muutoksia. Vähentynyt antioksidanttitaso sekä vähentynyt GSH-GSSH tai askorbaatti-dehydroaskorbaattisuhde ovat merkkejä lisääntyneestä oksidatiivisesta stressistä. Suurin virhelähde tämän tyyppisissä mittauksissa on näytteenä olevan kudoksen auto-oksidaatio näytteenoton jälkeen. Auto-oksidaation tapahtuminen johtaa oksidatiivisen stressin yliarviointiin.

Koska oksidatiiviset vauriot kohdistuvat tyypillisesti DNA:han, proteiineihin tai rasvoihin, on kullekin vauriotyypille kehitetty oma määritysmenetelmänsä (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). DNA:han kohdistuvia vaurioita voidaan mitata COMET-analyysillä. COMET- analyysi on geelielektroforeesiin perustuva menetelmä, joka puolikvantitatiivisesti laskee DNA-juosteiden katkeamia yksittäisessä solussa. Hapettuneita nukleotideja tai nukleosidejä voidaan myös määrittää

nestekromatografialla tai massaspektometrillä. Myös näissä menetelmissä on näytteen oton jälkeen tapahtuva hapettuminen osoittautunut huomattavaksi ongelmaksi.

Proteiinien hapettumisen mittaamista käytetään usein oksidatiivisten vaurioiden arvioimiseen, koska niiden määritysmenetelmä on teknisesti yksinkertainen (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Menetelmässä arvioidaan aminohappojen hapettumista mittaamalla karbonyyliryhmien määrää kolorometrisesti. Karbonyylissä on hiili- ja happiatomi kiinni toisissaan kaksoissidoksella. Usein näyte käsitellään dinitrofenyylihydratsiinilla, joka muodostaa karbonyyliryhmien kanssa voimakkaan absorbanssin antavan johdannaisen. Lisääntynyttä absorbanssia pidetään merkkinä lisääntyneestä proteiinien hapettumisesta.

Rasvojen hapettumisen mittaamisessa on monia menetelmiä, mutta tärkeimmät ovat malondialdehydin (MDA) ja isoprostaanien määrittämiseen perustuvat menetelmät (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). MDA:n määrityksessä näyte käsitellään ensin tiobarbituraattihapolla (TBA) ja sen jälkeen MDA:n määrä mitataan spektrofotometrisesti. Tätä menetelmää kutsutaan TBARS-menetelmäksi (thiobarbituric acid reactive substances) MDA:n määritystä on kritisoitu matalan spesifisyyden ja suuren artefaktojen esiintymisriskin vuoksi. TBA-käsittely itsessään tuottaa MDA:ta ja toisaalta MDA:ta tuotetaan elimistössä muissakin tilanteissa kuin rasvojen hapettumisessa. Silti TBARS on yhä edelleen käytetyin menetelmä rasvojen hapettumisen mittauksessa, koska se on yksinkertainen. TBARS-menetelmää on kehitetty erottelemaan paremmin näytteen alkuperäistä MDA:ta. MDA:ta voidaan mitata myös nestekromatografialla, joka on spesifien ja sensitiivinen MDA:lle eikä mittaa muiden aldehydien esiintymistä näytteessä (Bouwstra ym. 2008). Halliwell ja Gutteridge (2007) pitävät isoprostaanien mittaamista parhaana lipidiperoksidaation määritysmenetelmänä. Aiemmin isoprostaanien määritys vaati massaspektrometrin, mikä rajoitti tämän määritysmenetelmän käyttöä (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Nykyään isoprostaanien määritykseen on saatavilla kaupallisia ELISA-testejä.

Monet merkkiaineista määritetään verinäytteistä. Hivenaineiden osalta on esitetty, ettei verinäytteestä tehty antioksidanttimääritys ole paras tapa selvittää eläimen hivenainetasoja. Esimerkiksi kuparin osalta paremmaksi vaihtoehdoksi on esitetty maksa-analyysiä (Scaletti ym. 2003).

Antioksidanttisen puolustusjärjestelmän aktivoitumista voidaan arvioida merkkiaineiden lisäksi mittaamalla puolustusjärjestelmään kuuluvien geenien ilmentymistä geenilastutekniikalla (cDNA-microarray). Geenilastutekniikkaa ja PCR-tekniikkaa hyödyntämällä on mitattu esimerkiksi glutationiperoksidaasin ja superoksididismutaasin esiintymistä maitorauhaskudoksessa (Singh ym. 2008, Aitken ym. 2009).

6.1.1 Merkkiaineet ja määritysmenetelmät lypsylehmillä

Taulukkoon 1 on koottu lypsylehmillä käytetyt oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien merkkiaineet ja määritysmenetelmät.

Taulukko 1. Merkkiaineet ja määritysmenetelmät kudoksittain lypsylehmillä tehdyissä oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien tutkimuksissa.
[1]Total antioxidant status, kokonaisantioksidanttistatus
[2]Thiobarbituric acid reactive substances, tiobarbituraattihappoon reagoivien aineiden määritys
[3] Kaupallisia testejä

Kudos	Antioksidantti -lisä	Patologinen tai fysiologinen tila	Merkkiaineet	Määritysmenetelmä	Viite
Plasma	-	Poikiminen	Malondialdehydi TAS[1]	Kolorometria (Calbiochem)[3] ABTS$^+$ -testi (Randox Laboratories)[3]	Castillo ym. 2006 ja Castillo ym. 2005
Plasma	-	Kliininen ja piilevä utaretulehdus	Malondialdehydi Glutationi β-karoteeni α-tokoferoli C-vitamiini	TBARS[2] Spektrofotometria Spektrofotometria Spektrofotometria Kolorimetria	Kizil ym. 2007
Plasma	-	Piilevä utaretulehdus	Malondialdehydi Glutationi β-karoteeni α-tokoferoli Askorbiinihappo Keruloplasmiini	TBARS[2] Spektrofotometria Spektrofotometria Spektrofotometria Kolorometria Oksidaasiaktiivisuus	Musal ym. 2007
Plasma	-	Kliininen ja piilevä utaretulehdus	Malondialdehydi (punasoluissa) Askorbiinihappo Sinkki Kupari	TBARS[2] Spektrofotometria Spektrofotometria Spektrofotometria	Ranjan ym. 2005
Plasma	Kupari	Utaretulehdus (*E. coli*)	Kupari Keruloplasmiini Seleeni	Spektrofotometria Oksidaasiaktiivisuus Fluorometria	Scaletti ym. 2003
Istukka ja sikiökalvot	-	Jälkeisten jääminen	TAC[1]	Spektrofotometria	Kankofer ym. 2005
Seerumi	α-tokoferoli β-karoteeni	Poikiminen, jälkeisten jäänti ja utaretulehdus	α-tokoferoli β-karoteeni	Nestekromatografia Nestekromatografia	LeBlanc ym. 2004
Plasma	-	Poikiminen	Vapaat radikaalit Malondialdehydi Tiolit Glutationiperoksidaasi Superoksididismutaasi	d-Rom test[3] TBARS[2] SHp Test[3] Ransel[3] Ransod[3]	Bernabucci ym. 2005
Seerumi, Maksa ja Maito	E-vitamiini	Poikiminen	Malondialdehydi α-tokoferoli	Nestekromatografia (Chromsystems)[3] Nestekromatografia (Chromsystems)[3]	Bouwstra ym. 2008
Maito	-	Utaretulehdus (*E. coli*)	C-vitamiini	Nestekromatografia	Weiss ym. 2004
Plasma	α-tokoferoli β-karoteeni	Poikiminen	α-tokoferoli β-karoteeni	Nestekromatografia Nestekromatografia	Chawla & Kaur 2004
Plasma	E-vitamiini ja seleeni	Jälkeisten jäänti	Malondialdehydi (punasoluissa)	TBARS[2]	Gupta ym. 2005

Uusimmissa oksidatiivista stressiä koskevissa lypsylehmä tutkimuksissa on selvitetty oksidatiivisen stressin merkkiaineiden tasoa poikimisen tienoilla olevalla lypsylehmällä.

Malondialdehydiä ja kokonaisantioksidanttustatusta (TAS) ovat tutkineet Castillo ym. (2005) ja Castillo ym. (2006). Heidän tutkimuksiensa tulokset on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Lypsylehmien veren keskimääräiset (±SE) malondialdehydi (MDA) –ja kokonaisantioksidantti (TAS)pitoisuudet lypsylehmillä eri laktaatiovaiheessa.

Laktaatiovaihe	MDA (μM/l)	Kokonaisantioksidantti-pitoisuus (mmol/l)	Viite
7 kk ennen poikimista	34.57 ± 2.40	0.189 ± 0.009	Castillo ym. 2006
10 vk ennen poikimista	36.60 ± 6.07	0.112 ± 0.001	Castillo ym. 2005
6 vk ennen poikimista	34.93 ± 3.40	0.174 ± 0.001	Castillo ym. 2005
2 vk ennen poikimista	31.24 ± 2.72	0.137 ± 0.002	Castillo ym. 2005
1 vk ennen poikimista	51.03 ± 20.42	0.180 ± 0.001	Castillo ym. 2005
1 vk poikimisen jälkeen	68.99 ± 33.64	0.247 ± 0.002	Castillo ym. 2006
2 vk poikimisen jälkeen	35.53 ± 5.86	0.192 ± 0.001	Castillo ym. 2006
4 vk poikimisen jälkeen	42.10 ± 6.46	0.157 ± 0.002	Castillo ym. 2006
6 vk poikimisen jälkeen	33.01 ± 4.25	0.178 ± 0.004	Castillo ym. 2006
8 vk poikimisen jälkeen	28.87 ± 5.33	0.154 ± 0.002	Castillo ym. 2006

Antioksidanttien vaikutuksia oksidatiivisen stressin merkkiaineisiin on tutkittu lihanaudoilla (Gatellier ym. 2004, Descalzo ym. 2005, Descalzo ym. 2007, Insani ym. 2008) ja vasikoilla (Mokhber-Dezfouli ym. 2008, Shinde ym. 2008) Lypsylehmillä merkkiaineita on tutkittu vain vähän (Bouwstra ym. 2008). Antioksidanttien tasoa nautojen veressä Bouwstran ym. (2008) tutkimuksessa E-vitamiinilisän (3000 k.y/pv) vaikutusta tutkittiin MDA:n arvoihin veressä, maksassa ja maitonäytteissä ensimmäistä kertaa poikivilla hiehoilla. E-vitamiinilisä ei estänyt MDA-arvojen nousua veressä poikimisen aikana, mutta kaksi viikkoa poikimisen jälkeen E-vitamiinilisää saaneiden hiehojen MDA-arvot laskivat tilastollisesti merkitsevästi alhaisemmaksi kuin ilman E-vitamiinilisää olleen vertailuryhmän. E-vitamiinilla oli melkein merkitsevästi vaikutusta maksan MDA-arvoihin ($p>0.10$), mutta ei merkitsevää vaikutusta maidon tai veren MDA-arvoihin. Tutkijat esittivät tämän perusteella, että seerumin MDA ei välttämättä kuvaa oksidatiivisen stressin ja E-vitamiinin tasoa eläimessä kokonaisvaltaisesti.

Uusimmissa tutkimuksissa lypsylehmillä seleenin (Weiss & Hogan 2005, Ibeagha ym. 2009) ja C-vitamiinin (Weiss & Hogan 2007) vaikutuksia on tutkittu oksidatiivisen stressin merkkiaineiden sijasta neutrofiilien toimintakokeilla (Rinaldi ym. 2007). Useita neutrofiilien toimintakokeita on vertailtu Rinaldin ym. (2007) tutkimuksessa.

6.1.2 Merkkiaineet ja määritysmenetelmät lihasioilla

Sikojen lihanlaatututkimuksissa käytetyt merkkiaineet ja määritysmenetelmät on koottu taulukkoon 3.

Taulukko 3. Merkkiaineet ja määritysmenetelmät kudoksittain lihasioilla tehdyissä antioksidanttitutkimuksissa.

[1] Thiobarbituric acid reactive substances, tiobarbituraattihappoon reagoivien aineiden määritys

Kudos	Antioksidanttilisä	Merkkiaineet	Määritysmenetelmä	Viite
Lihas	E-vitamiini	α-tokoferoli Malondialdehydi	Nestekromatokrafia TBARS[1]	Guo ym. 2006a
Plasma	E-vitamiini	α-tokoferoli	Nestekromatografia	Guo ym. 2006a
Seerumi	Seleeni	Seleeni Malondialdehydi Glutationiperoksidaasi	-	Zhan ym. 2007
Lihas	Seleeni	Seleeni Malondialdehydi Glutationiperoksidaasi	-	Zhan ym. 2007
Lihas	E- ja C-vitamiini	Malondialdehydi E-vitamiini C-vitamiini	TBARS[1] Nestekromatokrafia Nestekromatokrafia	Gebert ym. 2006
Lihas ja seerumi	Seleeni	Seleeni	Fluorometri	Mateo ym. 2007
Lihas	E-vitamiini	Malondialdehydi	TBARS[1]	Guo ym. 2006b

6.2 Koeasetelmat

Eläinlääketieteessä suoritettavat tutkimukset voidaan jakaa havaintotutkimuksiin ja kliinisiin kokeisiin (Thrusfield 2007). Havaintotutkimukset ovat epidemiologisia tutkimuksia, joita käytetään esimerkiksi tietylle taudille altistavien riskitekijöiden selvittämiseen (poikittaistutkimus ja tapausverrokkitutkimus) tai syy-seuraussuhteiden tutkimiseen (kohorttitutkimus). Kliiniset kokeet voidaan puolestaan jakaa tutkimustiloilla kontrolloiduissa olosuhteissa suoritettaviin koe-eläinkokeisiin ja useilla yksityisillä tiloilla suoritettuihin kenttäkokeisiin.

Koe-eläinkokeissa tutkimuksissa käytettäviä koeasetelmia ovat esimerkiksi rinnakkaisryhmä ja faktorikoe (Thrusfield 2007). Rinnakkaisryhmäkokeissa koe-eläimet jaetaan käsittelyryhmiin yksinkertaisesti satunnaistamalla tai satunnaistamalla

lohkoja. Satunnaistettujen lohkojen (block randomization) kokeessa lohkottamisella pienennetään eläinyksilöistä johtuvaa vaihtelua (Ranta ym. 1991). Eläimet voidaan lohkottaa homogeenisiksi ryhmiksi esimerkiksi sukupuolen tai iän perusteella. Faktorikokeessa tutkitaan kahden tai useamman tekijän eli faktorin vaikutusta tutkittavana olevaan ilmiöön (Thrusfield 2007). Jos esimerkiksi 2×2 faktorikokeessa ensimmäinen faktori on käsittelyn A läsnäolo tai puuttuminen (a=2) ja toinen faktori on käsittelyn B läsnäolo tai puuttuminen (b=2), niin eläimet pitää jakaa satunnaisesti neljään eri käsittelyryhmään: käsittely A, käsittely B, käsittely A+B ja ei käsittelyä A tai B.

6.2.1 Koeasetelmat lypsylehmätutkimuksissa

Lypsylehmillä tehtyjen koe-eläintutkimusten koeasetelmat, käsittelyt, otoskoot ja muuttujat ovat koottu liitteeseen 1. Näiden lisäksi lypsylehmillä antioksidanttien vaikutuksia on tutkittu paljon kenttäkokeiden (LeBlanc ym. 2002, Persson-Waller ym. 2007, Bourne ym. 2008) ja meta-analyysien avulla (Moyo ym. 2005, Bourne ym. 2007, Ceballos ym. 2009). Meta-analyysi kokoaa yhteen tiedot useista tutkimuksista, jolloin otoskoko kasvaa (Riffenburgh 2006). Meta-analyysi käsittelee useita tutkimuksia ikään kuin yhden kokeen toistoina. Tämä vähentää tyypin 1 ja 2 virheitä. Meta-analyysi on hyvä tutkimusmenetelmä, kun kyseessä on tauti, jossa on pieni vallitsevuus (prevalenssi), kuten esimerkiksi jälkeisten jäämisessä (Bourne ym. 2007). Meta-analyysin huonona puolena on julkaisuharha, joka tarkoittaa positiivisten tutkimustulosten yliedustusta. Antioksidantteina toimivien hivenaineiden tasosta lypsylehmillä on saatu tietoa erilaisten havaintotutkimusten avulla, joissa on kerätty veri tai maitonäytteitä useista karjoista (Enjalbert ym. 2006). Näissä tutkimuksissa hivenainetasot on yhdistetty terveystietoihin, jotka on saatu erilaisista terveysrekistereistä.

6.2.2 Koeasetelmat sikatutkimuksissa

Lihasioilla tehtyjen antioksidanttitutkimusten koeasetelmat, käsittelyt, otoskoot ja muuttujat on koottu liitteeseen 2.

7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

7.1 Oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien vaikutukset

Vapaiden radikaalien aiheuttamat oksidatiiviset vauriot kohdistuvat solussa rasvoihin, valkuaisaineisiin tai nukleiinihappoihin. Solujen sisäisiä antioksidantteja ovat katalaasi, superoksididismutaasi, sekä glutationi- ja tioreduksinjärjestelmään kuuluvat entsyymit. Ravinnosta saataviin antioksidantteihin kuuluvat hivenaineina tunnetut seleeni, kupari ja sinkki, vitamiineina tunnetut C- ja E-vitamiini sekä A-vitamiinin esiasteena tunnettu β-karoteeni. Hivenaineet toimivat solunsisäisten antioksidanttisten entsyymien, kuten superoksidismutaasin ja glutationiperoksidaasin osana. E-vitamiini ja karotenoidit ovat rasvaliukoisia aineita, jotka pääasiassa suojaavat rasvojen hapettumiselta. C-vitamiini ja glutationi ovat vesiliukoisia aineita, jotka voivat suojata rasvojen, proteiinien ja nukleiinihappojen hapettumiselta. Antioksidantit toimivat yhteistyössä.

E-vitamiinia ja seleeniä on tutkittu antioksidanteista eniten. Antioksidanteilla on vaikutusta eläinten immuniteetin toimintaan neutrofiilien toiminnan kautta. Lypsylehmillä poikimisen tienoilla esiintyvien tautien, kuten utaretulehduksen, jälkeisten jäämisen ja kohtutulehdusten on todettu olevan yhteydessä oksidatiiviseen stressiin. Tulokset antioksidanttien vaikutuksista näiden sairauksien ehkäisyssä ovat olleet vaihtelevia. Tulosten vaihtelua selittää antioksidanttien väliset yhdysvaikutukset sekä vaikeus arvioida antioksidanttien saantia perusdieetistä. Antioksidantin kemiallinen muoto, antoreitti, annos, ajoitus ja kesto myös aiheuttavat vaihtelua tuloksiin.

Lihanlaatuun liittyvissä tutkimuksissa antioksidanteilla on todettu olevan yhteys lihan väriin, vedensidontakykyyn ja rasvojen härskiintymiseen. Naudoilla antioksidanttien vaikutus lihan punaisen värin säilyvyyteen on suurempi kuin sioilla. Karotenoideilla on vaikutusta naudan rasvakudoksen väriin. E-vitamiinilisä parantaa sianlihan säilyvyyttä vähentämällä rasvojen härskiintymistä ja parantamalla vedensidontakykyä. Eläimen antioksidanttien saanti vaikuttaa myös lihan rasvahappokoostumukseen ja antioksidanttipitoisuuteen. Rehun mukana annetuilla antioksidanteilla on todettu olevan vaikutusta maidon rasvapitoisuuteen, rasvahappokoostumukseen ja maidon sisältämien antioksidanttien määrään.

7.2 Antioksidanttien tutkimusmenetelmät

Eri merkkiaineiden ja määritysmenetelmien käyttö oksidatiivisen stressin ja antioksidanttien tutkimisessa lypsylehmillä on vielä melko vakiintumatonta. Monien merkkiaineiden tasosta terveillä eläimellä on vielä melko vähän tietoa. Tason määrittämistä vaikeuttaa määritysmenetelmien monimuotoisuus. Antioksidanttien vaikutusmekanismit ovat vielä osittain melko epäselviä ja sopivia merkkiaineita ja määritysmenetelmiä ollaan vasta tutkimassa. Samanlaisia tutkimuksia kuin Castillo ym. (2005) ja Castillo ym. (2006) ovat tehneet malondialdehydin tasosta lypsylehmillä, tarvittaisiin vielä lisää muiden merkkiaineiden osalta.

Sikojen lihanlaatu tutkimuksissa merkkiaineiden käyttö on jo vakiintuneempaa kuin lypsylehmätutkimuksissa. Toisaalta antioksidanttien lisäyksen tarve lihasioilla, eli rasvojen härskiintymisen estäminen, on yksinkertaisempi ilmiö kuin poikimisen tienoilla olevan lehmän monisyytaustaisten sairauksien ehkäisy. Sikojen lihanlaatu tutkimuksia voitaisiin kehittää ottamalla käyttöön isoprostaanimääritys. Uusimmat tutkimukset pitävät isoprostaaneja spesifisempänä merkkiaineena rasvojen hapettumiselle kuin malondialdehydiä.

Monissa lypsylehmätutkimuksissa on keskitytty määrittämään yhden antioksidanttilisän vaikutuksia yhteen veren antioksidantin pitoisuuteen, kuten esimerkiksi E-vitamiinin vaikutuksia plasman α-tokoferolin pitoisuuteen. Koska siirtymäkauden lehmien sairauksien syyt ovat monisyiset, kannattaisi antioksidanttitutkimuksissa keskittyä selvittämään yhtäaikaa useiden antioksidanttisesti vaikuttavien aineiden vaikutusta useisiin merkkiaineisiin ja kokonaisantioksidanttistatukseen. Tutkimustiedon lisääntyessä merkkiaineiden ja patologisten tilojen välille voitaisiin löytää lisää yhteyksiä samaan tapaan kuin C-vitamiinitason ja utaretulehduksen välille on jo joissakin tutkimuksissa löydetty.

Oikeiden merkkiaineiden selvittämisen lisäksi lisää tutkimusta tarvittaisiin oikeiden kudosnäytteiden ottamisesta merkkiaineiden määritystä varten. Nyt tutkimus on keskittynyt esimerkiksi lypsylehmien oksidatiivisen stressin tutkimuksessa verinäytteiden tutkimiseen, mutta on viitteitä, että esimerkiksi kuparitasoja ei kannattaisi määrittää verestä vaan maksasta. Antioksidanttien annoskokoon, imeytymisnopeuden, kudoksiin kulkeutumisen tehokkuudesta pitäisi saada lisää tietoa.

Myös eri kemiallisten muotojen hyväksikäyttävyyttä tuotantoeläinten ruokinnassa tulisi tutkia.

Tuotantoeläimillä tehtyjen kliinisten koe-eläinkokeiden koeasetelmina on käytetty rinnakkaisryhmää tai faktorikoetta. Faktorikoe vaikuttaisi sopivan paremmin antioksidanttien tutkimiseen, koska faktorikokeen etuna on mahdollisuus tutkia yhdysvaikutuksia. Faktorikoetta on käytetty paljon lihanlaatu tutkimuksissa sioilla, mutta sen käyttöä kannattaisi laajentaa myös lypsylehmätutkimuksiin. Sillä voitaisiin tutkia esimerkiksi E-vitamiinin ja seleenin yhdysvaikutuksia erilaisilla tasoilla. Lohkottamalla eläimet homogeenisiin ryhmiin ja lisäämällä toistojen määrää lisätään kliinisten kokeiden luotettavuutta.

Antioksidanttien terveysvaikutuksia on tutkittu kliinisten kokeiden lisäksi meta-analyyseilla ja kenttäkokeilla, joiden vahvuutena kliinisiin kokeisiin verrattuna on iso otoskoko. Meta-analyysien ongelmana on kuitenkin julkaisuharha. Lisäksi niihin mukaan otettavilla tutkimuksilla tulisi olla myös olla tarkat valintakriteerit, koska meta-analyysi käsittelee erillisiä tutkimuksia ikään kuin yhden kokeen toistoina. Kenttäkokeissa tietoa on kerätty useilta eri tiloilta. Tällaisissa tutkimuksissa tulisi perusrehujen antioksidanttitaso määrittää hyvin tarkkaan ja lohkottaa tilat sen mukaan, jotta lähtötaso voidaan huomioida tilastollisessa mallissa ja todellinen antioksidanttilisän vaikutus saada selville.

Monissa antioksidanttitutkimuksissa käytetyt vitamiini- ja hivenainetasot ovat moninkertaisia esimerkiksi suomalaisiin ruokintasuosituksiin verrattuna. Yhdessäkään artikkelissa ei raportoitu mahdollisia vitamiinien tai hivenaineiden yliannostuksesta johtuvia ongelmia. Ennen kuin korkeita vitamiini- ja hivenainetasoja voidaan suositella laajempaan käyttöön, on niiden vaikutuksia tutkittava tarkasti eläinten terveyteen ja hyvinvointiin. Tästä esimerkkinä lampailla tehty tutkimus korkean E-vitamiini- ja hivenainelisän haitallisesta vaikutuksesta karitsojen suolen vasta-aineiden imeytymiskykyyn.

KIITOKSET

Haluan kiittää tuotantoeläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Eeva Mustosta ja MMM Mikko Anttilaa hyvästä ohjauksesta, tuesta ja kritiikistä koko tutkielman työstämisen ajan. Kiitokset MMT Eija Helanderille työn alkuvaiheessa tapahtuneesta ideoinnista ja Professori Timo Soverille arvokkaista kommenteista työn loppuvaiheessa. Tutkielmani rahoittajana toimi Hankkija-Maatalous Oy.

Kiitos avomiehelleni Panulle kannustamisesta, ymmärtämisestä ja auttamisesta koko projektin ajan. Kiitokset myös vanhemmilleni ja ystävilleni, jotka ovat tukeneet lisensiaatintutkielmani valmistumista monin eri tavoin.

LÄHTEET

Agabriel, C., Cornu, A., Journal, C., Sibra, C., Grolier, P. & Martin, B. 2007. Tanker milk variability according to farm feeding practices: vitamins A and E, carotenoids, color, and terpenoids. *Journal of Dairy Science* 90: 4884-4896.

Ahola, J.K., Baker, D.S., Burns, P.D., Mortimer, R.G., Enns, R.M., Whittier, J.C., Geary, T.W. & Engle, T.E. 2004. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *Journal of Animal Science* 82: 2375-2383.

Aitken, S.L., Karcher, E.L., Rezamand, P., Gandy, J.C., VandeHaar, M.J., Capuco, A.V. & Sordillo, L.M. 2009. Evaluation of antioxidant and proinflammatory gene expression in bovine mammary tissue during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 92: 589-598.

Andrieu, S. 2008. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? *The Veterinary Journal* 176: 77-83.

Asri Rezaei, S. & Dalir-Naghadeh, B. 2006. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with Theileria annulata. *Veterinary Parasitology* 142: 179-186.

Baldi, A. 2005. Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science* 98: 117-122.

Baldi, A., Savoini, G., Pinotti, L., Monfardini, E., Cheli, F. & Orto, V.D. 2000. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 47: 599-608.

Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272: 20313-20316.

Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. & Nardone, A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2017-2026.

Blatt, D.H., Pryor, W.A., Mata, J.E. & Rodriguez-Proteau, R. 2004. Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural α-tocopherol: experimental and clinical observations. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15: 380-395.

Boland, T.M., Keane, N., Nowakowski, P., Brophy, P.O. & Crosby, T.F. 2005. High mineral and vitamin E intake by pregnant ewes lowers colostral immunoglobulin G absorption by the lamb. *Journal of Animal Science* 83: 871-878.

Bourne, N., Laven, R., Wathes, D.C., Martinez, T. & McGowan, M. 2007. A meta-analysis of the effects of Vitamin E supplementation on the incidence of retained foetal membranes in dairy cows. *Theriogenology* 67: 494-501.

Bourne, N., Wathes, D.C., Lawrence, K.E., McGowan, M. & Laven, R.A. 2008. The effect of parenteral supplementation of vitamin E with selenium on the health and productivity of dairy cattle in the UK. *Veterinary Journal* 177: 381-387.

Bouwstra, R.J., Goselink, R.M.A., Dobbelaar, P., Nielen, M., Newbold, J.R. & van Werven, T. 2008. The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. *Journal of Dairy Science* 91: 977-987.

Buckley, D.J., Morrissey, P.A. & Gray, J.I. 1995. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science* 73: 3122-3130.

Burton, J.L., Madsen, S.A., Chang, L., Weber, P.S.D., Buckham, K.R., van Dorp, R., Hickey, M. & Earley, B. 2005. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105: 197-219.

Calderon, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. & Noziere, P. 2007a. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *Journal of Dairy Science* 90: 2335-2346.

Calderon, F., Chauveau-Duriot, B., Pradel, P., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. & Noziere, P. 2007b. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk following a shift from hay diet to diets containing increasing levels of carotenoids and vitamin E. *Journal of Dairy Science* 90: 5651-5664.

Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V. & Benedito, J.L. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal* 169: 286-292.

Castillo, C., Hernández, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M.L. & Benedito, J.L. 2006. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 80: 133-139.

Ceballos, A., Sanchez, J., Stryhn, H., Montgomery, J.B., Barkema, H.W. & Wichtel, J.J. 2009. Meta-analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle. *Journal of Dairy Science* 92: 324-342.

Chawla, R. & Kaur, H. 2004. Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α-tocopherol and β-carotene. *Animal Feed Science and Technology* 114: 279-285.

Chew, B.P. & Park, J.S. 2004. Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition* 134: 257-261.

Choubert, G. & Storebakken, T. 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture* 81: 69-77.

Cummins, K.A., Solaiman, S.G. & Bergen, W.G. 2008. The effect of dietary copper supplementation on fatty acid profile and oxidative stability of adipose depots in Boer x Spanish goats. *Journal of Animal Science* 86: 390-396.

Cusack, P., Mcmeniman, N. & Lean, I. 2008. Effects of injectable vitamins A, D, E and C on the health and growth rate of feedlot cattle destined for the Australian domestic market. *Australian Veterinary Journal* 86: 81-87.

Cusack, P., McMeniman, N., Rabiee, A. & Lean, I. 2009. Assessment of the effects of supplementation with vitamin E on health and production of feedlot cattle using meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 88: 229-246.

Daniel, L.R., Chew, B.P., Tanaka, T.S. & Tjoelker, L.W. 1991. Beta-carotene and vitamin A effects on bovine phagocyte function in vitro during the peripartum period. *Journal of Dairy Science* 74: 124-131.

De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J. & Lekeux, P. 2005. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal* 169: 65-74.

De Moffarts, B., Portier, K., Kirschvink, N., Coudert, J., Fellmann, N., van Erck, E., Letellier, C., Motta, C., Pincemail, J., Art, T. & Lekeux, P. 2007. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n − 3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *The Veterinary Journal* 174: 113-121.

Deaton, C.M., Marlin, D.J., Smith, N.C., Harris, P.A., Roberts, C.A., Schroter, R.C. & Kelly, F.J. 2004a. Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic acid concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 65: 80-87.

Deaton, C.M., Marlin, D.J., Smith, N.C., Smith, K.C., Newton, R.J., Gower, S.M., Cade, S.M., Roberts, C.A., Harris, P.A., Schroter, R.C. & Kelly, F.J. 2004b. Breath gondensate hydrogen peroxide correlates with both airway cytology and epithelial lining fluid ascorbic acid concentration in the horse. *Free Radical Research* 38: 201-208.

Demirel, G., Wachira, A.M., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Wood, J.D. & Enser, M. 2004. Effects of dietary *n*-3 polyunsaturated fatty acids, breed and dietary vitamin E on the fatty acids of lamb muscle, liver and adipose tissue. *British Journal of Nutrition* 91: 551.

Den Hertog-Meischke, M.J.A., Smulders, F.J.M., Houben, J.H. & Eikelenboom, G. 1997. The effect of dietary vitamin E supplementation on drip loss of bovine Longissimus lumborum, psoas major and Semitendinosus muscles. *Meat Science* 45: 153-160.

Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A. & Josifovich, J.A. 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* 70: 35-44.

Descalzo, A.M., Rossetti, L., Grigioni, G., Irurueta, M., Sancho, A.M., Carrete, J. & Pensel, N.A. 2007. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science* 75: 299-307.

Ducusin, R.J.T., Uzuka, Y., Satoh, E., Otani, M., Nishimura, M., Tanabe, S. & Sarashina, T. 2003. Effects of extracellular Ca2+ on phagocytosis and intracellular Ca2+ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Research in Veterinary Science* 75: 27-32.

Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P. & Moloney, A.P. 2009. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Science* 81: 28-45.

Dunshea, F.R., D'Souza, D.N., Pethick, D.W., Harper, G.S. & Warner, R.D. 2005. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Science* 71: 8-38.

Eder, K., Müller, G., Kluge, H., Hirche, F. & Brandsch, C. 2005. Concentrations of oxysterols in meat and meat products from pigs fed diets differing in the type of fat (palm oil or soybean oil) and vitamin E concentrations. *Meat Science* 70: 15-23.

Engle, T.E. & Spears, J.W. 2000. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *Journal of Animal Science* 78: 2452-2458.

Enjalbert, F., Lebreton, P. & Salat, O. 2006. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: retrospective study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90: 459-466.

Fragou, S., Fegeros, K., Xylouri, E., Baldi, A. & Politis, I. 2004. Effect of vitamin E supplementation on various functional properties of macrophages and neutrophils obtained from weaned piglets. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 51: 178-183.

Gatellier, P., Mercier, Y. & Renerre, M. 2004. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science* 67: 385-394.

Gebert, S., Eichenberger, B., Pfirter, H.P. & Wenk, C. 2006. Influence of different dietary vitamin C levels on vitamin E and C content and oxidative stability in various tissues and stored m. longissimus dorsi of growing pigs. *Meat Science* 73: 362-367.

Givens, D.I., Allison, R., Cottrill, B. & Blake, J.S. 2004. Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 811-817.

Griffiths, L.M., Loeffler, S.H., Socha, M.T., Tomlinson, D.J. & Johnson, A.B. 2007. Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand. *Animal Feed Science and Technology* 137: 69-83.

Grignard, E., Morin, J., Vernet, P. & Drevet, J.R. 2005. GPX5 orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals. *Theriogenology* 64: 1016-1033.

Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science* 73: 2820-2833.

Guo, Q., Richert, B.T., Burgess, J.R., Webel, D.M., Orr, D.E., Blair, M., Fitzner, G.E., Hall, D.D., Grant, A.L. & Gerrard, D.E. 2006a. Effects of dietary vitamin E and fat supplementation on pork quality. *Journal of Animal Science* 84: 3089-3099.

Guo, Q., Richert, B.T., Burgess, J.R., Webel, D.M., Orr, D.E., Blair, M., Grant, A.L. & Gerrard, D.E. 2006b. Effect of dietary vitamin E supplementation and feeding period on pork quality. *Journal of Animal Science* 84: 3071-3078.

Gupta, S., Kumar, H. & Soni, J. 2005. Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 64: 1273-1286.

Guyot, H., Spring, P., Andrieu, S. & Rollin, F. 2007. Comparative responses to sodium selenite and organic selenium supplements in Belgian Blue cows and calves. *Livestock Science* 111: 259-263.

Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35: 1147-1150.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4. painos. New York: Oxford University Press. 851 s.

Hasty, J.L., van Heugten, E., See, M.T. & Larick, D.K. 2002. Effect of vitamin E on improving fresh pork quality in Berkshire- and Hampshire-sired pigs. *Journal of Animal Science* 80: 3230-3237.

Heinrichs, A.J., Costello, S.S. & Jones, C.M. 2009. Control of heifer mastitis by nutrition. *Veterinary Microbiology* 134: 172-176.

Högberg, A. 2002. *Fatty acids, tocopherols and lipid oxidation in pig muscle: effects of feed, sex and outdoor rearing.* Uppsala: Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences. 62 s.

Houben, J.H., Eikelenboom, G. & Hoving-Bolink, A.H. 1998. Effect of the dietary supplementation with vitamin E on colour stability and lipid oxidation in packaged, minced pork. *Meat Science* 48: 265-273.

Ibeagha, A.E., Ibeagha-Awemu, E.M., Mehrzad, J., Baurhoo, B., Kgwatalala, P. & Zhao, X. 2009. The effect of selenium sources and supplementation on neutrophil functions in dairy cows. *Animal* 3: 1037-1043.

Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., Barriga-Soca, I.d.A. & Vernon-Carter, J.E. 2006. Comparison of red chilli (Capsicum annuum) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (Oncorhyncus mykiss) fillet pigmentation. *Aquaculture* 258: 487-495.

Insani, E.M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A.M., Pensel, N.A. & Descalzo, A.M. 2008. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. *Meat Science* 79: 444-452.

Jensen, C., Guider, J., Skovgaar, I.M., Staun, H., Skibsted, L.H., Jensen, S.K., Møller, A.J., Buckley, J. & Bertelsen, G. 1997. Effects of dietary α-tocopheryl acetate supplementation on α-tocopherol deposition in porcine m. psoas major and m.

longissimus dorsi and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Science* 45: 491-500.

Jensen, C., Lauridsen, C. & Bertelsen, G. 1998. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology* 9: 62-72.

Jensen, S.K. & Lauridsen, C. 2007. Alpha-tocopherol stereoisomers. *Vitamins and Hormones* 76: 281-308.

Jukola, E. 1994. *Selenium, vitamin E, vitamin A and beta-carotene status of cattle in Finland, with special reference to epidemiological udder health and reproduction data.* Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu. 195 s.

Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E. & Bertin, G. 2008. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *Journal of Animal Science* 86: 3100-3109.

Kakhlon, O. & Cabantchik, Z.I. 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 1037-1046.

Kankofer, M. 2002. Placental release/retention in cows and its relation to peroxidative damage of macromolecules. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 27-30.

Kankofer, M., Lipko, J. & Zdunczyk, S. 2005. Total antioxidant capacity of bovine spontaneously released and retained placenta. *Pathophysiology* 11: 215-219.

Kankofer, M. & Lipko-Przybylska, J. 2008. Physiological antioxidative/oxidative status in bovine colostrum and mature milk. *Acta Veterinaria-Beograd* 58: 231-239.

Kay, J.K., Roche, J.R., Kolver, E.S., Thomson, N.A. & Baumgard, L.H. 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 72: 322.

Kerth, C.R., Braden, K.W., Cox, R., Kerth, L.K. & Rankins, J., D.L. 2007. Carcass, sensory, fat color, and consumer acceptance characteristics of Angus-cross steers

finished on ryegrass (Lolium multiflorum) forage or on a high-concentrate diet. *Meat Science* 75: 324-331.

Kessler, J., Morel, I., Dufey, P.A., Gutzwiller, A., Stern, A. & Geyer, H. 2003. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass, meat and claw quality in fattening bulls. *Livestock Production Science* 81: 161-171.

Kimura, K., Reinhardt, T.A. & Goff, J.P. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: 2588-2595.

Kimura, K., Goff, J.P., Kehrli Jr, M.E. & Reinhardt, T.A. 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85: 544-550.

Kirschvink, N., Moffarts, B.d. & Lekeux, P. 2008. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal* 177: 178-191.

Kizil, O., Akar, Y., Saat, N., Kizil, M. & Yukseu, M. 2007. The plasma lipid peroxidation intensity (MDA) and chain-breaking antioxidant concentrations in the cows with clinic or subclinic mastitis. *Revue De Medecine Veterinaire* 158: 529-533.

Knowles, S.O., Grace, N.D., Wurms, K. & Lee, J. 1999. Significance of Amount and Form of Dietary Selenium on Blood, Milk, and Casein Selenium Concentrations in Grazing Cows. *Journal of Dairy Science* 82: 429-437.

Kupiainen, V., Dredge, K., Sankari, S. & Soveri, T. 2004. Nautojen seleenistatus Etelä-Savon tavanomaisilla ja luomulypsykarjatiloilla. *Suomen Eläinlääkärilehti* 12: 639-646.

Lapointe, J. & Bilodeau, J.F. 2003. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 68: 1157-1164.

Lauridsen, C., Engel, H., Craig, A.M. & Traber, M.G. 2002a. Relative bioactivity of dietary RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetates in swine assessed with deuterium-labeled vitamin E. *Journal of Animal Science* 80: 702-707.

Lauridsen, C., Engel, H., Jensen, S.K., Craig, A.M. & Traber, M.G. 2002b. Lactating sows and suckling piglets preferentially incorporate RRR- over all-rac-alpha-tocopherol into milk, plasma and tissues. *Journal of Nutrition* 132: 1258-1264.

Lauridsen, C. & Jensen, S.K. 2005. Influence of supplementation of all-rac-alpha-tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on alpha-tocopherol and immune responses of piglets. *Journal of Animal Science* 83: 1274-1286.

Lauzon, K., Zhao, X., Bouetard, A., Delbecchi, L., Paquette, B. & Lacasse, P. 2005. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science* 88: 4295-4303.

Lawrie, R.A. & Ledward, D. 2006. Lawrie's meat science. 7. painos. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LCC. 442 s.

LeBlanc, S.J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Veterinary Journal* 176: 102-114.

LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Bateman, K.G., TenHag, J., Walton, J.S. & Johnson, W.H. 2002. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 1416-1426.

LeBlanc, S.J., Herdt, T.H., Seymour, W.M., Duffield, T.F. & Leslie, K.E. 2004. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *Journal of Dairy Science* 87: 609-619.

Liu, Z.L., Yang, D.P., Chen, P., Dong Wei X. & Wang, D.M. 2008. Supplementation with selenium and vitamin E improves milk fat depression and fatty acid composition in dairy cows fed fat diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. <http://findarticles.com/p/articles/mi_6917/is_6_21/ai_n28526067/>, haettu 19.9.2009.

Liu, H.C., Chen, W.L. & Mao, S.J.T. 2007. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 90: 547-555.

Luciano, G., Monahan, F.J., Vasta, V., Biondi, L., Lanza, M. & Priolo, A. 2009. Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science* 81: 120-125.

Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173: 502-511.

Macit, M., Aksakal, V., Emsen, E., Esenbuga, N. & Irfan, A.M. 2003. Effects of vitamin E supplementation on fattening performance, non-carcass components and retail cut percentages, and meat quality traits of Awassi lambs. *Meat Science* 64: 1-6.

Mandal, G.P., Dass, R.S., Isore, D.P., Garg, A.K. & Ram, G.C. 2007. Effect of zinc supplementation from two sources on growth, nutrient utilization and immune response in male crossbred cattle (Bos indicus X Bos taurus) bulls. *Animal Feed Science and Technology* 138: 1-12.

Mateo, R.D., Spallholz, J.E., Elder, R., Yoon, I. & Kim, S.W. 2007. Efficacy of dietary selenium sources on growth and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing high endogenous selenium. *Journal of Animal Science* 85: 1177-1183.

Meglia, G.E., Jensen, S.K., Lauridsen, C. & Persson Waller, K. 2006. Alpha-tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. *The Journal of Dairy Research* 73: 227-234.

Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H. & Renerre, M. 1998. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in Turkey meat during storage. *Meat Science* 48: 301-318.

Mercier, Y., Gatellier, P., Vincent, A. & Renerre, M. 2001. Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Science* 58: 125-134.

Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science* 76: 2812-2823.

Mitsumoto, M., Ozawa, S., Mitsuhashi, T. & Koide, K. 1998. Effect of dietary vitamin E supplementation for one week before slaughter on drip, colour and lipid stability during display in Japanese Black steer beef. *Meat Science* 49: 165-174.

Mokhber-Dezfouli, M.R., Rahimikia, E., Asadi, F. & Nadalian, M.G. 2008. The Role of Route of Vitamin E Administration on the Plasma Antioxidant Activity and Lipid

Peroxidation in Newborn Calves. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103: 414-418.

Moreira, I. & Mahan, D.C. 2002. Effect of dietary levels of vitamin E (all-rac-tocopheryl acetate) with or without added fat on weanling pig performance and tissue alpha-tocopherol concentration. *Journal of Animal Science* 80: 663-669.

Morel, P.C.H., Janz, J.A.M., Zou, M., Purchas, R.W., Hendriks, W.H. & Wilkinson, B.H.P. 2008. The influence of diets supplemented with conjugated linoleic acid, selenium, and vitamin E, with or without animal protein, on the composition of pork from female pigs. *Journal of Animal Science* 86: 1145-1155.

Mortensen, A., Skibsted, L.H. & Truscott, T.G. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 13-19.

Moyo, N., Nielen, M., Kruitwagen, C. & Beynen, A.C. 2005. Vitamin E supplementation and udder health: A meta-analysis. Teoksessa: Hogeveen, H. (toim.). *Mastitis in dairy production. Current knowledge and future solutions.* 1 painos. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. s. 159-165.

MTT 2006. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset 2006 : märehtijät - siat - siipikarja - turkiseläimet - hevoset. *MTT:n selvityksiä* 106. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Jokioinen: 84 s.

Mulligan, F.J. & Doherty, M.L. 2008. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal* 176: 3-9.

Muramoto, T., Nakanishi, N., Shibata, M. & Aikawa, K. 2003. Effect of dietary β-carotene supplementation on beef color stability during display of two muscles from Japanese Black steers. *Meat Science* 63: 39-42.

Musal, B., Ulutas, P.A. & Turkylmaz, S. 2007. Blood vitamin C, vitamin A, beta - carotene, ceruloplasmin, glutathione and malondialdehyde concentrations in cows with subclinical mastitis treated with intramammary antibiotics. *Revue De Medecine Veterinaire* 158: 633-640.

Mustacich, D.J., Bruno, R.S. & Traber, M.G. 2007. Vitamin E. *Vitamins and Hormones* 76: 1-21.

Naguib, Y.M.A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1150-1154.

Nakano, T., Tosa, M. & Takeuchi, M. 1995. Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1570-1573.

Neelesh, S. 2007. Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows: a review. *Asian Journal of Animal Veterinary Advances* 2: 50-62.

NRC 1998. Nutrient requirements of swine. 10. painos. National Research Council (U.S.). Subcommittee on Swine Nutrition. Washington, D.C., USA: 189 s.

NRC 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7. painos. National Research Council (U.S.). Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Washington, D.C., USA: 232 s.

NRC 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. painos. National Research Council (U.S.). Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Washington D.C., USA: 381 s.

O'Boyle, N., Corl, C.M., Gandy, J.C. & Sordillo, L.M. 2006. Relationship of body condition score and oxidant stress to tumor necrosis factor expression in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 297-304.

Ohtsuka, H., Watanabe, C., Kohiruimaki, M., Ando, T., Watanabe, D., Masui, M., Hayashi, T., Abe, R., Koiwa, M., Sato, S. & Kawamura, S. 2006. Comparison of two different nutritive conditions against the changes in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68: 1161-1166.

Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Majewski, A.C., McDowell, L.R. & Hansen, P.J. 2003. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *Journal of Dairy Science* 86: 2343-2351.

Pehrson, B., Ortman, K., Madjid, N. & Trafikowska, U. 1999. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. *Journal of Animal Science* 77: 3371-3376.

Persson-Waller, K., Hallen-Sandgren, C., Emanuelson, U. & Jensen, S.K. 2007. Supplementation of RRR-alpha-tocopheryl acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. *Journal of Dairy Science* 90: 3640-3646.

Phillips, A.L., Faustman, C., Lynch, M.P., Govoni, K.E., Hoagland, T.A. & Zinn, S.A. 2001. Effect of dietary α-tocopherol supplementation on color and lipid stability in pork. *Meat Science* 58: 389-393.

Pinelli-Saavedra, A., Calderón de la Barca, A.M., Hernández, J., Valenzuela, R. & Scaife, J.R. 2008. Effect of supplementing sows' feed with α-tocopherol acetate and vitamin C on transfer of α-tocopherol to piglet tissues, colostrum, and milk: Aspects of immune status of piglets. *Research in Veterinary Science* 85: 92-100.

Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E. & Larondelle, Y. 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science* 89: 685-692.

Przybylska, J., Albera, E. & Kankofer, M. 2007. Antioxidants in Bovine Colostrum. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 402-409.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. 2007. Diseases associated with nutritional deficiencies. Diseases associated with nutritional deficiencies. *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10 painos. New York: Elsevier Saunders. s. 1691-1783.

Ranjan, R., Swarup, D., Naresh, R. & Patra, R.C. 2005. Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Veterinary Research Communications* 29: 27-34.

Ranta, E., Rita, H. & Kouki, J. 1991. Biometria. Tilastotiedettä ekologeille. 7. painos. Helsinki: Yliopistopaino. 569 s.

Rebolé, A., Rodríguez, M.L., Ortiz, L.T., Alzueta, C., Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A. & Arija, I. 2006. Effect of dietary high-oleic acid sunflower seed, palm oil and vitamin E supplementation on broiler performance, fatty acid composition and oxidation susceptibility of meat. *British Poultry Science* 47: 581.

Riffenburgh, R.H. 2006. Statistics in medicine. 2. painos. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 622 s.

Rinaldi, M., Moroni, P., Paape, M.J. & Bannerman, D.D. 2008. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. *The Veterinary Journal* 178: 208-213.

Rinaldi, M., Moroni, P., Paape, M.J. & Bannerman, D.D. 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115: 107-125.

Roy, M., Gauvreau, D. & Bilodeau, J.F. 2008. Expression of superoxide dismutases in the bovine oviduct during the estrous cycle. *Theriogenology* 70: 836-842.

Saleh, M.A. 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with Babesia bigemina. *Research in Veterinary Science* 86: 43-48.

Saleh, M.A., Al-Salahy, M.B. & Sanousi, S.A. 2008. Corpuscular oxidative stress in desert sheep naturally deficient in copper. *Small Ruminant Research* 80: 33-38.

Salyer, G.B., Galyean, M.L., Defoor, P.J., Nunnery, G.A., Parsons, C.H. & Rivera, J.D. 2004. Effects of copper and zinc source on performance and humoral immune response of newly received, lightweight beef heifers. *Journal of Animal Science* 82: 2467-2473.

Santé-Lhoutellier, V., Engel, E. & Gatellier, P. 2008. Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. *Food Chemistry* 109: 573-579.

Scaletti, R.W., Trammell, D.S., Smith, B.A. & Harmon, R.J. 2003. Role of dietary copper in enhancing resistance to Escherichia coli mastitis. *Journal of Dairy Science* 86: 1240-1249.

Schmidt, T.B. & Olson, K.C. 2007. The effects of nutritional management on carcass merit of beef cattle and on sensory properties of beef. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 23: 151-163.

Sharma, M.C., Joshi, C., Pathak, N.N. & Kaur, H. 2005. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Research in Veterinary Science* 79: 113-123.

Shinde, P.L., Dass, R.S., Garg, A.K. & Pattanaik, A.K. 2008. Effect of vitamin E and selenium supplementation on antioxidant status of male buffalo (Bubalus bubalis) calves. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17: 318-327.

Singh, K., Davis, S.R., Dobson, J.M., Molenaar, A.J., Wheeler, T.T., Prosser, C.G., Farr, V.C., Oden, K., Swanson, K.M., Phyn, C.V.C., Hyndman, D.L., Wilson, T., Henderson, H.V. & Stelwagen, K. 2008. cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 91: 2236-2246.

Smet, K., Raes, K., Huyghebaert, G., Haak, L., Arnouts, S. & De Smet, S. 2008. Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science* 87: 1682-1688.

Smith, K.L., Harrison, J.H., Hancock, D.D., Todhunter, D.A. & Conrad, H.R. 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *Journal of Dairy Science* 67: 1293-1300.

Sordillo, L.M., O'Boyle, N., Gandy, J.C., Corl, C.M. & Hamilton, E. 2007. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 1186-1192.

Sordillo, L.M. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science* 98: 89-99.

Sordillo, L.M. & Aitken, S.L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 104-109.

Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327: 649-662.

Spears, J.W. & Weiss, W.P. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Veterinary Journal* 176: 70-76.

Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. & Wheeler, T.T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science* 87: 3-9.

Swanson, T.J., Hammer, C.J., Luther, J.S., Carlson, D.B., Taylor, J.B., Redmer, D.A., Neville, T.L., Reed, J.J., Reynolds, L.P., Caton, J.S. & Vonnahme, K.A. 2008. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *Journal of Animal Science* 86: 2415-2423.

Thrusfield, M.V. 2007. Veterinary epidemiology. 3. painos. Oxford, UK: Blackwell Publishing. 610 s.

Trigona, W.L., Mullarky, I.K., Cao, Y.Z. & Sordillo, L.M. 2006. Thioredoxin reductase regulates the induction of haem oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *Biochemical Journal* 394: 207-216.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

Walsh, K., O'Kiely, P., Moloney, A.P. & Boland, T.M. 2008. Intake, performance and carcass characteristics of beef cattle offered diets based on whole-crop wheat or forage maize relative to grass silage or ad libitum concentrates. *Livestock Science* 116: 223-236.

Wang, Y.Z., Xu, C.L., An, Z.H., Liu, J.X. & Feng, J. 2008. Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 140: 326-336.

Warren, H.E., Scollan, N.D., Nute, G.R., Hughes, S.I., Wood, J.D. & Richardson, R.I. 2008. Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. II: Meat stability and flavour. *Meat Science* 78: 270-278.

Weiss, W.P. & Hogan, J.S. 2007. Effects of dietary vitamin C on neutrophil function and responses to intramammary infusion of lipopolysaccharide in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 731-739.

Weiss, W.P. & Hogan, J.S. 2005. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 4366-4374.

Weiss, W.P., Hogan, J.S. & Smith, K.L. 2004. Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. *Journal of Dairy Science* 87: 32-37.

Weiss, W.P., Hogan, J.S. & Wyatt, D.J. 2009. Relative bioavailability of all-rac and RRR vitamin E based on neutrophil function and total alpha-tocopherol and isomer concentrations in periparturient dairy cows and their calves. *Journal of Dairy Science* 92: 720-731.

Weiss, W.P. & Wyatt, D.J. 2003. Effect of dietary fat and vitamin E on alpha-tocopherol in milk from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 3582-3591.

Wilburn, E.E., Mahan, D.C., Hill, D.A., Shipp, T.E. & Yang, H. 2008. An evaluation of natural (RRR-alpha-tocopheryl acetate) and synthetic (all-rac-alpha-tocopheryl acetate) vitamin E fortification in the diet or drinking water of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 86: 584-591.

Wilde, D. 2006. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 96: 240-249.

Zhan, X., Wang, M., Zhao, R., Li, W. & Xu, Z. 2007. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 132: 202-211.

Zhao, X. & Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science* 86: 57-65.

Liite 1. Lypsylehmillä tehtyjen antioksidanttitutkimusten käsittelyt, koeasetelmat, otoskoot ja muuttujat.

Antioksidantti	Käsittelyt	Koeasetelma, otos (n)	Muuttujat	Viite
E-vitamiini	lume tai kaksi 15 ml pistosta (2100 mg DL-α-tokoferoliasetaattia ja 7 mg natriumseleniittiä) pistoksena nahan alle	Rinnakkaisryhmä n=546	Maitotuotos, lisääntyminen, jälkeisten jääminen, kohdun tulehdusten ja utaretulehdusten esiintyminen	Bourne ym. 2008
E-vitamiini	lume tai tai yksi 20 ml pistos (1100 IU DL-α-tokoferoliasetaattia ja 30 mg natriumseleniittiä) pistoksena lihaksee	Satunnaistettujen lohkojen koe, rinnakkaisryhmä n=50	Jälkeisten jäännin esiintymien	Gupta ym. 2005
Seleeni	1. kontrolli, ei seleenilisää 2. 0.3 mg epäorgaanista seleeniä /kg ka 3. 0.5 mg epäorgaanista seleeniä /kg ka 4. 0.3 mg orgaanista seleeniä /kg ka ja 5. 0.5 mg orgaanista seleeniä /kg ka	Satunnaistettujen lohkojen koe, rinnakkaisryhmät, n=25	Neutrofiilien toiminta	Ibeagha ym. 2009
Seleeni	Orgaaninen seleeni tai natriumselenaattia 0.3 mg/ kg rehua.	Satunnaistettujen lohkojen koe, rinnakkaisryhmät,n=40	Neutrofiilien toiminta, seleenitaso seerumissa, maidossa ja vastasyntyneissä vasikoissa	Weiss & Hogan 2005
C-vitamiini	Fosforyloitu askorbiinihappo 30 g/d tai kontrolli (0g)	Satunnaistettujen lohkojen koe, rinnakkaisryhmä, n=31	Neutrofiilien toiminta ja vaste lipopolysakkaridi-infuusioon	Weiss & Hogan 2007

Liite 2. Lihasioilla tehtyjen antioksidanttitutkimusten käsittelyt, koeasetelmat, otoskoot ja muuttujat.

Antioksidantti	Käsittelyt	Koeasetelma, otos (n)	Muuttujat	Viite
E-vitamiini	Faktorit: 1. 40, 200 tai 400 mg / DL- α-tokoferolia kg rehua 2. Ruokinnan kesto: 3, 6 tai 9 vk ennen teurastusta	Satunnaistettujen lohkojen koe, 3×3 faktorikoe, n=81	Rasvojen härskiintyminen, vedensidontakyky, rasvahappokoostumus	Guo ym. 2006b
E-vitamiini	Faktorit: 1. Rasvalisä: maissi, maissi+öljy, maissi+öljy+ naudan tali 2. 40 IU DL- α-tokoferolia /kg tai 200 IU DL-α-tokoferolia /kg rehua	3×2 faktorikoe, n=600	Rasvojen härskiintyminen, rasvahappokoostumus, E-vitamiinipitoisuus plasmassa, lihaksessa ja rasvakudoksessa	Guo ym. 2006a
E-vitamiini	Faktorit: 1. Genotyyppi: Hampshire tai Bergshire 2. Sukupuoli: emakko tai kastroitu karju 3. E-vitamiinitaso: 12,1; 54,7; 98,8; 174,0 tai 350,6 IU α-tokoferoliasetaattia/ kg rehua	Satunnaistettujen lohkojen koe, 2×2×5, faktorikoe, n=240 eläintä	Päiväkasvu, rasvakerroksen paksuus, vedensidontakyky, lihan väri, rasvojen härskiintyminen, E-vitamiinipitoisuus seerumissa	Hasty ym. 2002
Seleeni	Viisi käsittelyä: Seleenin määrä 0 (negat. kontrolli), 0.1, 0.2 tai 0.3 mg orgaanista seleeniä/kg rehua tai 0.3 Na-seleniittä	Rinnakkaisryhmät, kuusi toistoa, n=180	Päiväkasvu, vedensidontakyky, seleenipitoisuus lihaksessa, seerumissa, maksassa ja karvoissa	Mateo ym. 2007
Seleeni	Kolme käsittelyä: kontrolli, 0.3 mg/kg rehua Se natriumseleniittinä ja 0.3 mg/kg Se selenometioniinina	Rinnakkaisryhmät, kolme toistoa, n=108	Lihan väri, vedesidontakyky, seleenipitoisuus seerumissa, lihaksessa ja muissa elimissä	Zhan ym. 2007