



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Nauk o Zwierzętach

mgr inż. Damian Bień

**Wpływ różnych form selenu i ekstraktu
z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.)
na wyniki odchowu oraz jakość mięsa
kurcząt brojlerów**

Effect of different forms of selenium and hemp
(*Cannabis sativa* L.) extract on the growth performance
and meat quality of broiler chickens

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Moniki Michalczuk, prof. SGGW

Instytut Nauk o Zwierzętach

Warszawa 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 18.06.2024r. Czytelny podpis promotora Monika Giedel

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 18.06.2024r. Czytelny podpis autora rozprawy Damian Bien

Składam serdeczne podziękowania

***Pani dr hab. Monice Michalczuk, prof. SGGW**
za wsparcie, życzliwość, opiekę naukową,
swobodę działania oraz wspianą atmosferę
pracy*

*Słowa podziękowania kieruję do moich
**Przyjaciół z Instytutu Nauk o Zwierzętach
i Katedry Nanobiotechnologii Instytutu Biologii
SGGW w Warszawie, którzy wspierali mnie
i niejednokrotnie służyli szczerą pomocą.
Za okazane wsparcie, nieocenioną motywację
i wiarę w moje możliwości nie tylko w trakcie
realizacji pracy doktorskiej***

Dziękuję

Spis treści

Streszczenie	9
Summary	11
Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	13
Objaśnienie zastosowanych skrótów	15
1. Wstęp	19
2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy	25
3. Materiały i metody	26
3.1. Doświadczenie I: Określenie wpływu różnych form selenu (selenian sodu, drożdże selenowe i nano-Se) w ilości 0,5 mg/1000 g podanych do paszy na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.	26
3.1.1. Formy selenu	26
3.1.2. Kurczęta brojlery oraz mieszanki paszowe zastosowane w ich żywieniu....	26
3.1.3. Ubój, analiza rzeźna, skład chemiczny i parametry fizykochemiczne mięśnia piersiowego.....	28
3.1.4. Analiza biochemiczna mięśnia piersiowego, wątroby i surowicy krwi	29
3.1.5. Koncentracja selenu w mięśni piersiowym i wątrobie	29
3.1.6. Właściwości przeciwutleniające mięśnia piersiowego, wątroby i surowicy krwi	30
3.1.7. Profil kwasów tłuszczowych mięśnia piersiowego i wątroby	31
3.1.8. Analiza ultrastruktury mięśnia piersiowego i wątroby kurcząt	31
3.1.9. Deklaracja etyczna.....	32
3.1.10. Analiza statystyczna	32
3.2. Doświadczenie II: Określenie wpływu ekstraktu z konopi siewnej (<i>Cannabis sativa</i> L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g podanego do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego poprzez podanie <i>per os</i> subklinicznych dawek <i>Clostridium perfringens</i> i liopolisacharydu z bakterii <i>E. Coli</i> na wyniki odchowu i jakość mięsa kurecząt brojlerów.	33

3.2.1. Skład chemiczny ekstraktu z konopi siewnej (<i>Cannabis sativa</i> L.) będącego źródłem kannabidiolu.....	33
3.2.2. Kurczęta brojlery i mieszanki paszowe zastosowane w ich żywieniu.....	33
3.2.3. Grupy doświadczalne i indukowany stan zapalny	33
3.2.4. Ubój i pobieranie prób do dalszych analiz.....	35
3.2.5. Ocena wydajności rzeźnej, składu chemicznego mięśnia piersiowego i wątroby oraz właściwości fizykochemicznych mięśnia piersiowego.....	35
3.2.6. Oznaczenie kolagenu typu III w mięśniu piersiowym, wątrobie i surowicy krwi	36
3.2.7. Profil kwasów tłuszczowych mięśnia piersiowego i wątroby	36
3.2.8. Analiza biochemiczna surowicy krwi.....	36
3.2.9. Właściwości przeciwutleniające mięśnia piersiowego i wątroby	36
3.2.10. Deklaracja etyczna	37
3.2.11. Analiza statystyczna.....	37
4. Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych.....	38
4.1.1. Doświadczenie I: Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens (Bień i in., 2023).....	38
4.1.2. Doświadczenie I: Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens (Bień i in., 2022).....	44
4.2. Doświadczenie II: Effects of <i>Cannabis sativa</i> extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with <i>Clostridium perfringens</i> and lipopolysaccharide (Bień i in., 2024).....	48
5. Wnioski	54
6. Zalecenia praktyczne.....	56
7. Bibliografia.....	57
8. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	75

Streszczenie

Potencjalnymi regulatorami oddziałującymi w sposób mechaniczny, humoralny, neurologiczny i immunologiczny na utrzymanie homeostazy kurcząt są kannabinoidy z konopi włóknistych (*Cannabis sativa* L.) oraz selen. Chociaż mechanizmy leżące u podstaw działania kannabinoidów i różnych form selenu nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione, można przyjąć, że związki te w odpowiednich ilościach mają potencjał do utrzymania homeostazy w organizmach kurcząt.

Na podstawie badań własnych stwierdzono, że zastosowanie dodatku drożdży selenowych i nanocząstek selenu (nano-Se) w ilości 0,5 mg/1000 g do paszy istotnie wpływa na zwiększoną koncentrację selenu w mięśniach piersiowych i wątrobie, zmianę profilu kwasów tłuszczowych, metabolizm lipidów i wskaźników oksydacyjnych. Zastosowanie nano-Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy zwiększają istotnie koncentrację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ochronę lipidów przed działaniem reaktywnych form tlenu. Stosowanie drożdży selenowych i nano-Se w żywieniu kurcząt brojlerów ma pozytywny wpływ na właściwości fizykochemiczne mięśnia piersiowego i ultrastrukturę mięśnia piersiowego oraz wątroby bez negatywnego wpływu na wyniki odchowu kurcząt.

Zastosowanie w żywieniu kurcząt dodatku ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g paszy zwiększa ubojową masę ciała. Zastosowanie badanego ekstraktu nie wpływa negatywnie na parametry fizykochemiczne mięśnia piersiowego i podstawowy skład chemiczny mięśnia piersiowego i wątroby. Ponadto, zastosowanie dodatku ekstraktu z konopi siewnej do paszy (30 g/1000 g) w żywieniu kurcząt pozwala na utrzymanie parametrów biochemicznych krwi i potencjału antyoksydacyjnego w warunkach stresowych, co przyczynia się do utrzymania ich homeostazy organizmu. Ekstrakt z konopi siewnej w ilości 30 g/1000 g do paszy może stanowić czynnik ochronny poprawiający oddech w warunkach intensywnej produkcji zwierzęcej.

Słowa kluczowe: kurczęta brojlery, selen, ekstrakt z konopi siewnej, jakość mięsa, indukowanie stanu zapalnego

Summary

Potential regulators with mechanistic, humoral, neurological, and immunological effects on the maintenance of homeostasis in chickens include cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) and selenium. Although the mechanisms underlying the effects of cannabinoids and various forms of selenium have not yet been fully elucidated, it is assumed that these compounds, in appropriate doses, have the potential to maintain homeostasis in chickens.

Research has shown that the addition of selenised yeast and selenium nanoparticles (nano-Se) at a concentration of 0.5 mg/kg of feed significantly influences selenium concentration in the breast muscle and liver. This supplementation alters the fatty acid profile, lipid metabolism, and oxidative indices. Specifically, the application of nano-Se at a rate of 0.5 mg/kg of feed significantly increases the concentration of polyunsaturated fatty acids and enhances the protection of lipids against reactive oxygen species. The use of selenised yeast and nano-Se in broiler chicken nutrition has a positive impact on the physico-chemical properties of the breast muscle and the ultrastructure of the breast muscle and liver, without adversely affecting broiler performance.

The addition of hemp (*Cannabis sativa* L.) extract, a source of cannabidiol, at a dosage of 30 g/1000 g of feed in chicken nutrition increases slaughter body weight. The use of the tested extract does not negatively impact the physicochemical parameters and basic chemical composition of the pectoral muscle and liver. Furthermore, the addition of 30 g/1000 g of feed of hemp extract in chicken nutrition helps maintain biochemical blood parameters and antioxidant potential under stress conditions, contributing to the maintenance of their homeostasis. Hemp extract at a dosage of 30 g/1000 g of feed may serve as a protective factor improving rearing in conditions of intensive animal production.

Keywords: broiler chickens, selenium, cannabidiol hemp extract, meat quality, induction of inflammation

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Rozprawę doktorską pt.: „Wpływ różnych form selenu i ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) na wyniki odchowu oraz jakość mięsa kurcząt brojlerów,, stanowi zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

1. **Bień Damian***, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. **2023**. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 905.

IF = 7,000; 140 pkt.; Cytowania: WoS = 5; Scopus = 6

2. **Bień Damian***, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. **2022**. Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11.

IF = 4,600; 140 pkt.; Cytowania: WoS = 8; Scopus = 8

3. **Bień Damian***, Michalczuk Monika, Józwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. **2024**. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108.

IF = 1,000; 100 pkt.; Cytowania: WoS = 0; Scopus = 0

Łączny IF trzech publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi **IF = 12,600 i 380 pkt.** wg. punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

**autor korespondencyjny*

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu OPUS 15: „Bioaktywność kannabidiolu i nano-selenu w utrzymaniu potencjału immunologicznego oraz integralności przewodu pokarmowego u kurcząt”. Nr projektu badawczego: 2018/29/B/NZ9/01351

Objaśnienie zastosowanych skrótów

ΔE – względna różnica barw

AA - kwas arachidonowy

AcP – aktywność fosfatazy kwaśnej

aGLU – alfa-glukozydaza

AI – wskaźnik aterogenności

ALA – kwas α-linolenowy, C18:3

AlaAP – aminopeptydaza alaninowa

ALP – fosfataza alkaliczna

ALT – aminotransferaza alaninowa

ArgAP – aminopeptydaza argininowa

AST – aminotransferaza asparaginianowa

BA – kwas żółciowy

BGAL – beta-galaktozydaza

BGLU – beta-glukozydaza

BGRD – beta-glukuronidaza

CBD – ekstrakt z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu (30 g/1000 g paszy)

CFU – jednostki tworzące kolonię

CH – grupy poddane działaniu stanu zapalnego

CH1 – grupa doświadczalna (dośw. II), jak kontrolna, ale z podaniem *per os* *C. perfringens*

CH1+CBD – grupa doświadczalna (dośw. II), *C. perfringens* + ekstrakt z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu do paszy (30 g/1000 g)

CH2 – grupa doświadczalna (dośw. II), jak kontrolna, ale z podaniem *per os* lipopolisacharydu *E. coli*

CH2 + CBD – grupa doświadczalna (dośw. II), LPS (*E. coli*) + ekstrakt z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu do paszy (30 g/1000 g)

CK – kinaza kreatyninowa

CON – grupa kontrolna

Cys. - cysteina

d. - dzień

DGLA – kwas dihomog- γ -linolenowy

DHA – kwas dokozaheksaenowy

DI – desaturaza $\Delta 9$

DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

EPA – kwas dokozaheksaenowy

FCR – współczynnik konwersji paszy

Fe – żelazo

GGTP – gamma-GT, aminotransferaza

GLA – kwas γ -linolenowy

GLDH – dehydrogenaza glutaminianowa

GPX – peroksydazy glutationowe

GSH – glutation

GSH-Px1 – peroksydaza glutationowa

h/H - wskaźnik hipocholesterolemii i hipercholesterolemii

HEX – N-acetylo-BD-heksozoaminidaza

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HMSeBA - kwas 2-hydroksy-4-metyloselenobutanowy

InP – fosfor nieorganiczny

IT – wskaźnik trombogenności

K – potas

LA – kwas linolowy

LDH – ehydrogenaza mleczanowa

LeuAP – aminopeptydaza leucynowa

LPS – lipopolisacharyd (*E. coli*, serotyp O55)

MAN – mannozydaza

ME – energia metaboliczna

MDA – dialdehyd malonowy

Met. - metionina

MUFA – kwasy tłuszczowe jednonienasycone

n-3 – kwasy tłuszczowe omega-3

n-6 – kwasy tłuszczowe omega-6

Na – sód

nano-Se – nanocząstki selenu

NIR – spektroskopia bliskiej podczerwieni

OA – kwas oleinowy

PA – kwas palmitynowy

PTP – kanał o wysokiej przewodności

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

RDI – zalecane dziennie spożycie

Se – selen

SeCys – selenocysteina

SeMet – selenometionina

SFA – kwasy tłuszczowe nasycone

T1 – grupa doświadczalna (dośw. I), pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów ze zwiększonym dodatkiem nieorganicznej formy Se - selenianu sodu (0,5 mg/1000 g paszy)

T2 – grupa doświadczalna (dośw. I), pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów z dodatkiem Se w formie organicznej (drożdże selenowe, preparat komercyjny) (0,5 mg/1000 g paszy)

T3 – grupa doświadczalna (dośw. I), pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów z dodatkiem Se w formie nanocząstek (preparat komercyjny) (0,5 mg/1000 g paszy)

TBA – kwas 2-tiobarbiturowy

TCh – cholesterol całkowity

TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy

THC – tetrahydrokannabinol

TP – białko całkowite

TR – reduktaza tioredoksyny

TTG – trójglicerydy

UA – kwas moczowy

WHC – wodochłonność, zdolność utrzymania wody własnej

1. Wstęp

Odchów kurcząt w intensywnych systemach produkcji zwierzęcej może obniżyć ich odporność na czynniki stresogenne, co prowadzi do licznych problemów zdrowotnych. Osłabiona odporność i długotrwały stres mogą nie tylko negatywnie wpływać na poziom dobrostanu ptaków, ale także obniżyć jakość mięsa, przeznaczonego do obrotu handlowego. Dlatego istnieje potrzeba poszukiwania rozwiązań zapobiegających negatywnym skutkom stresu. Nie ustalono jednoznacznie, który z czynników obecnych w chowie kurcząt - stres, patogeny, czy stan zapalny - ma największy wpływ na obniżenie poziomu dobrostanu ptaków. Dlatego konieczne jest opracowanie nowoczesnych i kompleksowych rozwiązań.

W ostatniej dekadzie obserwuje się intensywny wzrost produkcji drobiarskiej. Roczna produkcja mięsa drobiowego na świecie osiągnęła poziom ponad 100 mln ton (Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa, 2023), co czyni ten sektor najszybciej rozwijającym się sektorem produkcji zwierzęcej, z perspektywą dalszego rozwoju. Jednak odchów kurcząt brojlerów w intensywnych systemach produkcji może obniżać ich odporność na czynniki stresowe, co przyczynia się do występowania problemów zdrowotnych, które wpływają także na jakość i właściwości fizykochemiczne mięsa. Skutki uboczne obejmują straty produkcyjne związane z pogorszeniem wyników odchowu, wzrostem zachorowalności i upadków z powodu np. stanów zapalnych. Szacuje się, że w 2023 r. sam wpływ ptasiej grypy kosztował światowy przemysł drobiarski około 3 miliardy dolarów. Liczba ta obejmuje bezpośrednie straty spowodowane ubojem zakażonych ptaków, spadkiem produkcji i zakłóceniami w handlu (Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych Zagraniczna Służba Rolna, 2024).

Ograniczenie występowania stanów zapalnych u kurcząt wywołanych różnymi czynnikami stresogennymi może być w pewnym stopniu osiągnięte poprzez wdrożenie odpowiednich praktyk bioasekuracji oraz zastosowanie alternatywnych metod, niekoniecznie farmakologicznych. W związku z tym, że układ pokarmowy kurcząt, wraz z zasiedlającymi go mikroorganizmami jelitowymi, pełni istotną rolę w obronie przed patogenami i w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej, metody żywieniowe mają potencjał wzmocnienia odporności ptaków na czynniki stresowe. Kannabinoidy z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) oraz selen w formach innych niż nieorganiczny selenian sodu, mogą wywierać pozytywny wpływ na układ pokarmowy kurcząt poprzez

różnorodne mechanizmy, takie jak działanie mechaniczne, humoralne, neurologiczne i immunologiczne. Może to przyczynić się do zmniejszenia u ptaków podatności na infekcje oraz ograniczenie stanów zapalnych, a to z kolei na poprawę jakości mięsa.

Selen (Se) jest ważnym składnikiem paszy dla zwierząt oraz integralną częścią wielu selenoprotein niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. U kurcząt rola Se polega m.in. na łagodzeniu stresu oksydacyjnego, wzmocnieniu odpowiedzi immunologicznej i produkcji przeciwciał, normalizacji wzrostu i metabolizmu, prowadząc do wyższych wskaźników wzrostu i niższej śmiertelności oraz do poprawy jakości mięsa (Castets i in., 2011; Huang i in., 2011; Dudkiewicz i in., 2012; Potapenko i in., 2015; Seremelis i in., 2019; Yildiz i in., 2019; Konieczka i in., 2020). Istnieje wiele form Se, zarówno nieorganicznych: selenian sodu (Na_2SeO_4) i selenin sodu (Na_2SeO_3), jak i organicznych, takich jak selenometionina (SeMet) i selenocysteina (SeCys) (Michalczuk i in., 2021). Obecnie w paszach dla kurcząt głównie stosowane są nieorganiczne formy Se, jednakże badania nad alternatywnymi formami, zwłaszcza organicznymi, nabierają znaczenia ze względu na ich lepszą przyswajalność (Huang i in., 2011). Organiczne formy Se, takie jak drożdże selenowe, chelaty, czy kwas 2-hydroksy-4-metyloselenobutanowego (HMSeBA) mogą być bardziej skuteczne w odkładaniu Se w tkankach kurcząt niż formy nieorganiczne. HMSeBA lepiej odkłada Se w jajach i mięśniach niż drożdże selenowe (Marković i in., 2017; Konkol i in., 2021). Nano-Se mają podobną biodostępność co formy organiczne Se i znacznie niższą toksyczność niż formy nieorganiczne, takie jak selenian sodu (Konieczka i in., 2022a). Niedobór Se może prowadzić do wielu problemów zdrowotnych, takich jak: opóźnienie wzrostu, zmian skórnych, utraty okrywy włosowej, obniżenia reprodukcji atrofii trzustki, martwicy wątroby, dystrofii mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego czy choroby białych mięśni. Nadmiar Se może skutkować anomaliami rozwojowymi (Kim i Mahan, 2003; Lyonsi in., 2007; Huang i in., 2011; Batorska, 2013; Langauer-Lewowicka i Pawlas, 2016; Mangan i in., 2016). Zasadne jest prowadzenie dalszych badań nad zastosowaniem różnych form Se oraz opracowanie nowych, bardziej biodostępnych i mniej toksycznych form, zwłaszcza w rejonach o niedoborze Se w glebie np. na terenach Argentyny, Finlandii, Polski, Węgier, Serbii, południowo-wschodnich Chin czy zachodniej Australii (Oldfield, 2002; Wadgaonkar i in., 2018).

Zgodnie z regulacjami Unii Europejskiej, określonymi w art. 9t (b) dyrektywy Rady 70/524/EWG dotyczącej dodatków paszowych (2004/C 50/01) z 2004 roku, maksymalny poziom Se w paszach dla kurcząt został ustalony na poziomie 0,5 mg/1000 g paszy dla form nieorganicznych i 0,2 mg/1000 g paszy dla form organicznych. Przepis ten ma na celu zapewnienie bezpieczeństwa zadawania paszy. W kontekście tego wymogu, istnieje potrzeba przeprowadzenia bardziej szczegółowych badań, które pozwolą dokładnie zrozumieć mechanizm działania nowych form selenu. W literaturze naukowej obecne są doniesienia sugerujące, że dodatek Se do paszy powyżej zalecanej ilości (0,5 do 1 mg/1000 g paszy) może wykazywać pozytywny lub neutralny wpływ na ptaki (Placha i in., 2009; Konieczka i in., 2015; Michalczuk i in., 2021; Konieczka i in., 2022). Stale rosnąca wydajność wzrostowa kurcząt brojlerów, wymaga określenia wpływu zwiększonej ilości Se do paszy na ochronę organizmu ptaków przed negatywnymi skutkami stresu. Stwierdzono, że zwiększenie ilości selenu do paszy dla kurcząt może poprawić właściwości fizykochemiczne mięsa, strukturę mięśni szkieletowych oraz narządów wewnętrznych, takich jak wątroba. Istnieją doniesienia sugerujące, że dodatek selenu do pasz może zwiększyć zdolność utrzymania wody w mięśniach, poprawić profil kwasów tłuszczowych, wpłynąć na stabilność pigmentów hemowych oraz zwiększyć trwałość surowca w warunkach przechowywania (Mateo i in., 2007; Puerto i in., 2016; Han i in., 2017; Konieczka i in., 2022a). Dodatek selenu do paszy w ilościach zgodnych z przepisami może prowadzić do uzyskania produktów pochodzenia zwierzęcego o zwiększonej koncentracji tego pierwiastka, czyniąc je potencjalnie bardziej korzystnymi dla zdrowia człowieka.

Ze względu na historyczne uwarunkowania oraz warunki klimatyczne, Polska odznacza się długotrwałą tradycją uprawy i przetwórstwa konopi przemysłowych (konopie siewne, włókniste i przemysłowe to różne nazwy tej samej odmiany: *Cannabis sativa* L.). Dane historyczne wskazują, że na początku lat 30. XX wieku obszar upraw konopi przemysłowych wynosił około 30 tysięcy hektarów, głównie skoncentrowanych w rejonie Lublina oraz na Nizinie Śląskiej. Pomimo tradycji, popularność konopi przemysłowych zaczęła spadać od lat 60. XX wieku. Włókna konopne są zastępowane przez tańsze materiały tekstylne pochodzenia ropopochodnego, len oraz bawełnę. Dodatkowo, kampanie antynarkotykowe, często oparte na braku odpowiedniej wiedzy i rozróżnienia pomiędzy różnymi odmianami konopi, wpłynęły negatywnie na branżę konopi przemysłowych. W ostatnich latach nastąpił wyraźny wzrost zainteresowania uprawą konopi przemysłowych w Polsce. Dane dotyczące wniosków o dopłaty do upraw wskazują na wzrost obszaru uprawy o 79% w 2019 roku w porównaniu z poprzednimi latami, osiągając ponad 3 tysiące hektarów. Jest to największy wzrost od momentu przystąpienia Polski do Unii Europejskiej. Największy wzrost zainteresowania uprawą konopi przemysłowych odnotowano w województwach: mazowieckim, dolnośląskim i warmińsko-mazurskim. Jest to o tyle istotne, że dotychczasowe tradycje uprawy konopi nie były w tych regionach szczególnie silne (Kaniewski i in., 2017; Zadrożniak i in., 2017).

Obecnie obowiązujące polskie przepisy zezwalają na uprawę konopi przemysłowych, których zawartość THC (tetrahydrokannabinol) nie przekracza 0,2% w przeliczeniu na suchą masę. Jednakże brak klarownych wytycznych co do sposobu interpretacji tego limitu po przetworzeniu rośliny stanowi problem dla właścicieli upraw. Ponadto, istnieją rozbieżności w przepisach unijnych dotyczących produktów konopnych, co utrudnia jednolitą interpretację i stosowanie prawa w tej dziedzinie. W związku z powyższym, istnieje potrzeba opracowania jasnych i spójnych przepisów regulujących uprawę, przetwórstwo oraz sprzedaż produktów konopnych, uwzględniających zarówno wymogi krajowe, jak i unijne. Ujednolicenie i powstanie przejrzystych przepisów pozwoli na swobodne wykorzystywanie prozdrowotnych właściwości ekstraktów z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) w żywieniu zwierząt gospodarskich (Kaniewski i in., 2017; Zadrożniak i in., 2017).

W celu minimalizacji stosowania farmaceutyków w żywieniu zwierząt, poszukuje się alternatyw dla leków, które mogą wywierać podobne jak one działanie. Jednym z takich związków jest kannabidiol pochodzący z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.). Potencjał terapeutyczny kannabidiolu określono głównie w odniesieniu do medycyny człowieka oraz innych modeli zwierzęcych niż ptaki. Konopia indyjska (*Cannabis indica* L.), roślina znana jako marihuana lub marihuana lecznicza, jest bardziej krzaczasta i wykazuje właściwości toksyczne, które mogą mieć znaczenie lecznicze w odróżnieniu od konopi siewnej (Grotenhermen i in., 2017; Rehman i in., 2021). Konopia indyjska zawiera wyższy poziom Δ^9 tetrahydrokannabinolu (THC), natomiast konopia siewna (*Cannabis sativa* L.) nie wykazuje właściwości psychoaktywnych i stąd wzbudza zainteresowanie badaczy na świecie jako składnik bioaktywny w żywieniu zwierząt gospodarskich. Znaczenie konopi siewnej wynika m.in. ze składu chemicznego nasion i koncentracji kannabidiolu w roślinie, który nie wykazuje właściwości psychoaktywnych (Rehman i in., 2021). W porównaniu do konopi indyjskiej, konopia siewna ma niski poziom THC (mniej niż 0,3%) i wyższy poziom kannabidiolu (Fallahi i in., 2022). Działanie kannabidiolu jest ściśle związane z działaniem systemu endokannabidionowego. System ten jest rodzajem endogennego systemu sygnalizacyjnego regulującego sen, poziom stresu, łaknienie, aktywność ruchową, a te przyczyniają się do utrzymania homeostazy w organizmie. System endokannabidionowy jest obecny u bezkręgowców i kręgowców (Salzet i Stefano, 2002). Dodatkowo system ten odpowiada za łagodzenie bólu, pamięć, apetyt, reakcje przeciwzapalne, reguluje sen, rozród, immunosupresję, zmniejsza poziom stresu oksydacyjnego (Atalay i in., 2020; della Rocca i Di Salvo, 2020), zmniejszenie wydzielania soku żołądkowego, ochronę błony śluzowej żołądka, regulację motoryki układu pokarmowego, transport jonów, łagodzenie stanów zapalnych jelit oraz hamowanie proliferacji enterocytów (Klein i Cabral, 2006; Izzo i Sharkey, 2010; Konieczka i in., 2020). Niemniej, wpływ kannabidiolu na organizm kurcząt pozostaje niewyjaśniony ze względu na trudności w ustaleniu odpowiednich dawek leczniczych dla zwierząt. Badanie potwierdziło istnienie korelacji między reakcją jelitową a jakością mięsa kurcząt. Stwierdzono, że pasza zawierająca dodatek kannabidiolu zmniejszyła poziom lotnych związków w mięsie, które są związane z aktywnością bakterii (Konieczka i in., 2022a). Martwicze zapalenie jelit, wywołane przez beztlenową bakterię *Clostridium perfringens*, jest jedną z głównych przyczyn strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim (Skinner i in., 2010).

Bakteria ta wpływa na metabolizm lipidów poprzez regulację ekspresji genów związanych z katabolizmem kwasów tłuszczowych, co ma istotne znaczenie dla właściwości sensorycznych mięsa (Zhou i in., 2016). Istnieje wiele strategii mających na celu zapobieganie lub zmniejszenie negatywnego wpływu *C. perfringens* na organizm kurcząt, jednak ich skuteczność jest ograniczona ze względu na niewystarczającą znajomość mechanizmów działania tego mikroorganizmu (Olkowski i in., 2006; Keyburn i in., 2010; Keerqin i in., 2017). Niektóre szczepy *C. perfringens* wytwarzają enterotoksyny, które mogą wywołać biegunkę i skurcze brzucha zarówno u człowieka, jak i ptaków (Brynstad i Granum, 2002; Lahti i in., 2008; Lindström i in., 2011; Huang i in., 2018). Wprowadzenie dodatku kannabidiolu do paszy dla kurcząt może stanowić jedno z potencjalnych rozwiązań w zapobieganiu namnażania się *C. perfringens* oraz poprawie jakości mięsa. Endotoksyna bakteryjna lipopolisacharyd (LPS) stanowi wyzwanie w produkcji drobiarskiej. Kurczęta wydają się być odporne na działanie LPS w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt gospodarskich, to jednak jego obecność może negatywnie wpływać na wydajność i dobrostan ptaków (Raetz i Whitfield, 2002; Cheng i in., 2004; de Boever i in., 2009; Warren i in., 2010; Liu i in., 2015). Narażenie kurcząt brojlerów na działanie LPS wpływa na obniżenie przyrostów masy ciała i zwiększenie FCR. Dodatkowo LPS obniża wartości pH mięśni piersiowych i ud oraz zmniejsza odporności na utlenianie lipidów w mięsie (Morales-Lopez i Brufau, 2013).

Stosowanie w żywieniu kurcząt brojlerów dodatków paszowych, które zmniejszają ryzyko wywołania stanów zapalnych przez patogeny oraz zwiększają potencjał antyoksydacyjny, mogą znacząco poprawić stan zdrowia, dobrostan i jakość mięsa drobiowego. Choć mechanizmy działania różnych form selenu, zwłaszcza nowoodkrytych form oraz kannabinoidów nie są jeszcze w pełni poznane, badania sugerują, że związki te mogą regulować mechanizmy związane z odpornością na czynniki stresowe u ptaków. Różne formy selenu oraz kannabinoidy mogą mieć potencjał w polepszaniu ich stanu zdrowia, wyników odchowu, dobrostanu oraz jakości mięsa.

2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy

W pracy doktorskiej postawiono hipotezy badawcze w ramach dwóch doświadczeń:

H1: Zastosowanie różnych form selenu w ilości 0,5 mg/1000 g do paszy wpływa pozytywnie na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

H2: Zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g do paszy wpływa pozytywnie na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów w warunkach indukowanego stanu zapalnego.

Celem podjętych badań było określenie wpływu różnych form selenu w zwiększonej ilości (0,5 mg/1000 g) podanych do paszy i ekstraktu (30 g/1000 g) z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

Zakres badań:

- I. **Doświadczenie I:** Określenie wpływu różnych form selenu (selenian sodu, drożdże selenowe i nano-Se) w ilości 0,5 mg/1000 g podanych do paszy na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.
- II. **Doświadczenie II:** Określenie wpływu ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g podanego do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego poprzez podanie *per os* subklinicznych dawek *Clostridium perfringens* i liopolisacharydu z bakterii *E. Coli* na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

3. Materiały i metody

3.1. Doświadczenie I: Określenie wpływu różnych form selenu (selenian sodu, drożdże selenowe i nano-Se) w ilości 0,5 mg/1000 g podanych do paszy na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

3.1.1. Formy selenu

W żywieniu kurcząt z grup CON (kontrolna) i T1 (doświadczalna 1) zastosowano selenian sodu (odpowiednio 0,3 i 0,5 mg/1000 g paszy) wraz z premiksem witaminowo-mineralnym. W żywieniu kurcząt z grupy T2 (doświadczalna 2), Se w premiksie został zastąpiony drożdżami selenowymi (0,5 mg/1000 g paszy; produkt komercyjny: SelPlex 1000, Alltech, Nicholasville, KY, USA). W żywieniu kurcząt z grupy T3 (doświadczalna 3), Se w premiksie został zastąpiony Se w postaci nanocząstek Se (0,5 mg/1000 g paszy). Nano-Se w postaci nanoproszku otrzymano w drodze syntezy chemicznej. Zgodnie z deklaracją producenta (American Elements, Los Angeles, CA, USA), średni rozmiar cząstek wynosił 10-45 nm, powierzchnia właściwa około 30-50 m²/g, a czystość 99,9%.

3.1.2. Kurczęta brojlery oraz mieszanki paszowe zastosowane w ich żywieniu

Doświadczenie przeprowadzono na 300 kurczętach brojlerach Ross 308 losowo przydzielonych do 4 grup doświadczalnych, w 5 powtórzeniach, po 15 ptaków w powtórzeniu (schemat 1.). Odchów kurcząt trwał 6 tygodni. Ptaki miały swobodny dostęp do wody i zachowany cykl świetlny (zgodnie z Aviagen Ross 308: Broiler Performance Objectives. Aviagen Inc., Huntsville, AL, USA. 2019). Przez pierwsze 11 dni wszystkie ptaki żywione były taką samą mieszanką pełnoporcjową typu starter. W 12. dniu życia ptaki otrzymały odpowiednie mieszanki pełnoporcjowe typu grower (tabela 1.) uzupełnione o dodatek Se do paszy. Grupy doświadczalne różniły się pod względem formy i ilości Se podanych do paszy:

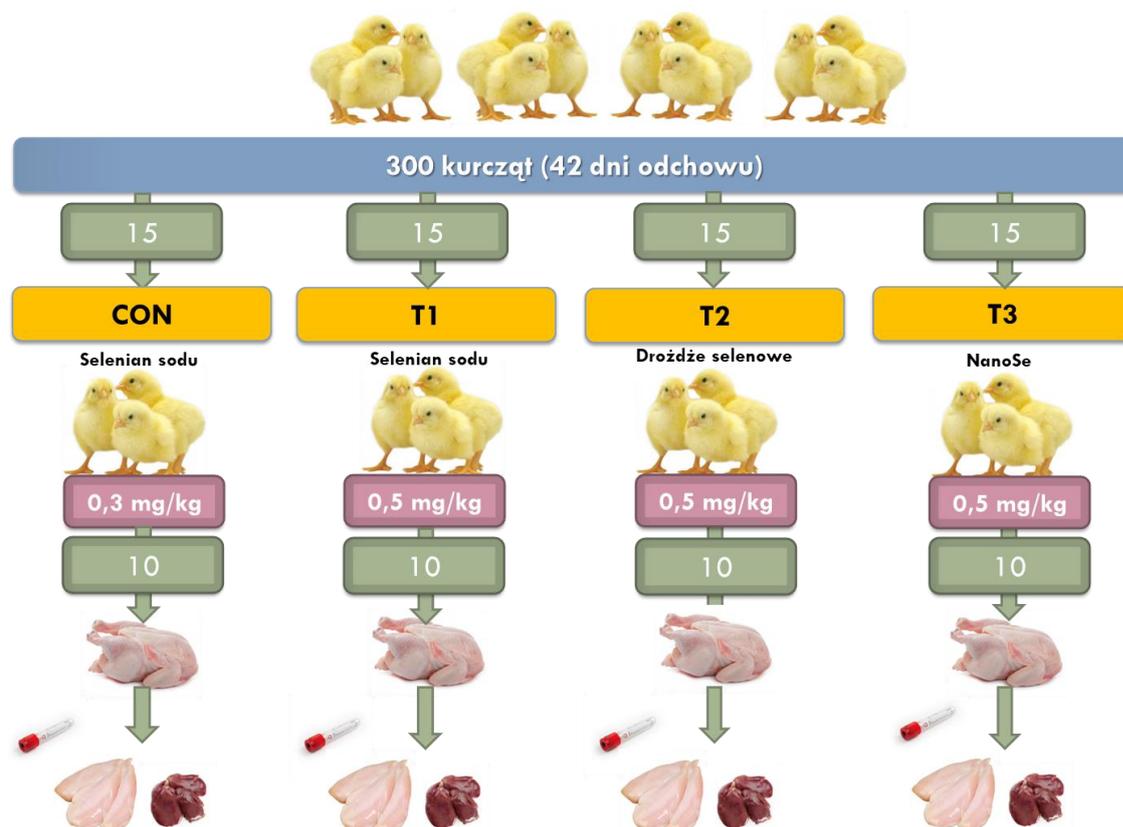
- **CON** (grupa kontrolna) – pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów z dodatkiem nieorganicznego Se w formie selenianu sodu (0,3 mg/1000 g paszy),
- **T1** – pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów ze zwiększonym dodatkiem nieorganicznej formy Se - selenianu sodu (0,5 mg/1000 g paszy),

- **T2** – pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów z dodatkiem Se w formie organicznej (drożdże selenowe, preparat komercyjny) (0,5 mg/1000 g paszy),
- **T3** – pełnoporcjowa mieszanka paszowa dla kurcząt brojlerów z dodatkiem Se w formie nanocząstek (preparat komercyjny) (0,5 mg/1000 g paszy).

Tabela 1. Skład mieszanek pełnoporcjowych

Składniki g/kg paszy	Starter 1-11 d.	Grower 12-42 d.	Składniki analityczne	Starter 1-11 d.	Grower 12-42 d.
Pszenica	439,1	462,9	ME (kcal/kg)	2900	3000
Kukurydza	200,0	200,0	Białko ogólne (g/kg)	22,0	20,0
Śruta poekst. sojowa	304,9	258,7	Metionina (g/kg)	0,61	0,56
Olej sojowy	17,5	44,4	Lizyna (g/kg)	1,36	1,20
NaCl	3,30	3,10	Met. + Cys (g/kg)	1,00	0,92
Kreda pastewna	13,7	12,4	Treonina (g/kg)	0,88	0,80
Fosforan jednowapniowy	8,50	6,50	Tryptofan (g/kg)	0,26	0,24
DL-metionina	3,00	2,70	Wapń (g/kg)	0,90	0,80
L-lizyna	3,80	3,30	Fosfor dostępny (g/kg)	0,61	0,54
Treonina	1,11	1,00			
Premiks wit.+ min.*	5,00	5,00			

*IU na kg paszy: wit. A, 10 000; wit. D3, 4500; mg: wit. E, 80; wit. B₁, 1,5; wit. B₂, 5; biotyna, 0,12; wit. B₆, 2,5; wit. B₁₂, 0,02; wit. K., 33; kwas nikotynowy, 50; kwas foliowy, 1,1; kwas pantotenowy, 14; cholina, 200; betaina, 160; Mn, 120; Zn, 100; Se, 0,35; Cu, 20; Fe, 40; J., 3; i Ca, 0,6.



Schemat 1. Układ przeprowadzonego doświadczenia z dodatkiem różnych form selenu do paszy

3.1.3. Ubój, analiza rzeźna, skład chemiczny i parametry fizykochemiczne mięśnia piersiowego

Po zakończeniu eksperymentu losowo wybrano po 10 kogutków ($n=10$) z każdej grupy i zważono je przed ubojem. Po uboju i schłodzeniu tuszek oceniono wydajność rzeźną oraz określono procentowy udział mięśnia piersiowego, nóg i podrobów (Michalczuk i in., 2016). Dla pobranych w trakcie dyssekcji próbek mięśnia piersiowego oznaczono podstawowy skład chemiczny: suchą masę, tłuszcz surowy, białko ogólne w tym kolagen i popiół ogólny. Oznaczenia wykonano metodą NIR (Michalczuk i in., 2016), pH_{24} zmierzono 24 godziny po uboju wykorzystując pH-metr CP-411 z elektrodą szklaną (Elmetron, Zabrze, Polska). Dodatkowo określono parametry barwy 24 godziny po uboju przy użyciu kolorymetru CR-410 (Minolta Ca. Ltd., Osaka, Japonia), gdzie każdy pomiar powtarzano dwukrotnie. Uzyskane wartości reprezentowały skalę jasności (parametr L_{24}^*) oraz stopień wysycenia barwą czerwoną (parametr a_{24}^*) i żółtą (parametr b_{24}^*) (Michalczuk i in., 2017), parametr ΔE (średnie odchylenie barwy) metodą opisaną przez Bendowskiego i in. (2022). Zdolność

utrzymania wody własnej (WHC) została określona zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Grau i Hamm (1953), pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a za wynik przyjęto wartość średnią.

3.1.4. Analiza biochemiczna mięśnia piersiowego, wątroby i surowicy krwi

W trakcie uboju dziesięć kogutków ($n = 10$) z każdej grupy zostało losowo wybranych do pobrania krwi pośmiertnej w ilości 1,5 ml/sztukę. Analiza laboratoryjna miała na celu określenie aktywności wybranych enzymów i związków przeciwutleniających w krwi oraz w próbkach mięśni piersiowych i wątrób (5 g/próbka).

W celu określenia wpływu różnych form i dwóch poziomów Se w paszy na stan zdrowia kurcząt, oznaczono aktywność następujących enzymów hydrolitycznych z surowicy krwi, wątroby i mięśni piersiowych kurcząt w laboratorium zewnętrznym: aminopeptydazy alaninowej (AlaAP, EC 3.4.11.2), aminopeptydazę leucynową (LeuAP, EC 3.4.11.1) i aminopeptydazę argininową (ArgAP, EC 3.4.11.6). Oznaczono dodatkowo: aktywność fosfatazy kwasnej (AcP, EC 3.1.3.2), beta-glukuronidazy (BGRD, EC 3.2.1.31), beta-galaktozydazy (BGAL, EC 3.2.1.23), beta-glukozydazę (BGLU, EC 3.2.1.21), alfa-glukozydazę (aGlu, EC 3.2.1.20), mannozydazę (MAN, EC 3.2.1.25) i N-acetylo-BD-heksozoaminidazę (HEX, EC 3.2.1.52).

Aktywność aminopeptydaz mierzono jako pochodne soli Fast Blue BB przy 540 nm metodą (Barrett i Heath, 1972), natomiast aktywność AcP, BGRD, BGAL, BGLU, aGLU, aMAN i HEX mierzono jako pochodne 4-nitrofenylowe przy 420 nm zgodnie z (Barrett i Heath, 1972). Wszystkie oznaczenia wykonano przy użyciu spektrofotometru Varian Cary 50 Bio UV-VIS (Santa Clara, CA, USA). Aktywność enzymu wyrażono w nmol/mg białka/h.

3.1.5. Koncentracja selenu w mięśniu piersiowym i wątrobie

Oznaczenie koncentracji Se w mięśniach piersiowych i wątróbach wykonano metodą PB-28/LF w akredytowanym laboratorium (Certyfikat Akredytacji PCA nr AB 1095 Wydanie nr 19 z dnia 1 stycznia 2022 r.). Przygotowano próbki zgodnie z normą PN-EN 13804, a następnie przeprowadzono mineralizację (MARS 5) zgodnie z normą PN-EN 13805. Oznaczenie zawartości Se w próbkach wykonano techniką ICP-MS (system Thermo XSERIES 2). Wyniki porównano z wielopierwiastkowym roztworem

wzorcowym ICP (19 pierwiastków w rozcieńczonym kwasie azotowym, CERTIPUR, 115474 Merck Millipore).

3.1.6. Właściwości przeciwutleniające mięśnia piersiowego, wątroby i surowicy krwi

Kwas 2-tiobarbiturowy (TBA) w mięśniu piersiowym, wątrobie i surowicy krwi oznaczono metodą według Shahidi (1984). Około 2 g próbki odważono do probówki wirówkowej z dokładnością do 0,01 g, do której dodano 5 cm³ 10% kwasu trichlorooctowego; następnie mieszaninę rozcierano przez 2 minuty za pomocą bagietki szklanej. Następnie dodano 5 cm³ 0,02 molowego roztworu TBA i próbkę ponownie rozcierano przez 2 minuty i wirowano przez 10 minut przy 4000 obr. Po odwirowaniu roztwór przefiltrowano do szklanej probówki, a po uszczelnieniu otworu folią polietylenową, barwę wywoływano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie pobrano próbki do oznaczeń kolorymetrycznych. Absorbancję mierzono za pomocą spektrofotometru Hitachi U-1100 przy długości fali 532 nm względem ślepej próby. Ślepa próba została przygotowana przez dodanie 5 cm³ 10% kwasu trichlorooctowego i 5 cm³ 0,02 molowego roztworu TBA do szklanej probówki.

Wykonano oznaczanie neutralizowania wolnego rodnika DPPH. Metoda bazuje na stabilnym wolnym rodniku 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylu i polega na kolorymetrycznym oznaczeniu zdolności do neutralizowania wolnych rodników przez badane próbki. Oznaczenie wykonano wg. metodyki zaproponowanej przez (Brand-Williams i in. (1995) z modyfikacjami. Odczynnik Folin-Ciocalteu został użyty jako odczynnik utleniający, a wszystkie chemikalia zostały zakupione od SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Monachium, Niemcy) w najwyższej dostępnej czystości. Absorbancję mierzono przy długości fali 517 nm. Wyniki wyliczono ze wzoru:

$$\text{ilość zredukowanego DPPH [\%]} = \frac{\text{Abs ślepa} - (\text{Abs badana} - \text{Abs kontrola})}{\text{Abs ślepa}} \times 100$$

Abs – wartość absorbancji próby ślepej, badanej i kontrolnej

Stężenie glutationu (GSH) zostało określone w mięśniu piersiowym, wątrobie i surowicy krwi za pomocą testu OXISRESEARCH BIOXYTECH GSH/GSSG-412™ (Foster City, CA, USA). Przed analizą próbki były zamrażane z dodatkiem M2VP (trifluorometanosulfonian 1-metylo-2-winylo-pirydyniowy) w temperaturze -80 °C. Uwolniony, zredukowany GSH oznaczano zgodnie ze szczegółową instrukcją

dostarczoną przez producenta zestawu. Odczyt absorbancji ($\lambda 412$) i pomiar kinetyki reakcji przeprowadzono przy użyciu czytnika mikropłytek Synergy 4 (BIOTEK; Winooski, VT, USA). Wyniki obliczono przy użyciu oprogramowania Gen5 (BIOTEK). Stężenie GSH wyrażono w grupach tiolowych (grupy mmol-SH).

3.1.7. Profil kwasów tłuszczowych mięśnia piersiowego i wątroby

Lipidy całkowite z mięśnia piersiowego i wątroby ekstrahowano zgodnie z procedurą opisaną przez Folch i in. (1957). Profil kwasów tłuszczowych oznaczono za pomocą chromatografu gazowego z detektorem FID zgodnie z PN-EN ISO: 5509, PN-EN ISO: 5508, jak wcześniej Ciemniowska-Żytkiewicz i in. (2015). Zastosowano kolumnę kapilarną Restek-2330, 105 m, 0,25 mm ID, 0,2 μm df (90% biscyjanopropyl/10% polisiloksan fenylocyjanopropylowy). Początkowa temperatura kolumny 100 °C przez 4 min. Następnie zwiększana do 240 °C z prędkością 3 °C/min. Temperatura końcowa była utrzymywana na minimalnym poziomie aż do elucji ostatniego piku chromatograficznego. Temperatura detektora FID 300 °C. Przepływ H_2 30 ml/min w detektorze FID, przepływ powietrza 350 ml/min w detektorze FID, przepływ N_2 (uzupełnianie) 15 ml/min w detektorze FID. Dla wszystkich kwasów tłuszczowych oznaczanych na podstawie wzorca zastosowano jednopunktową kalibrację detektora. Podczas kalibracji określono RF (współczynnik odpowiedzi) dla każdego estru metyloвого kwasu tłuszczowego. Krzywa kalibracji przy użyciu certyfikowanego materiału referencyjnego BCR-162R. Podstawowy wzorzec zawiera 37 kwasów tłuszczowych o takim samym lub podobnym składzie do wzorca "Supelco 37 Component Fame Mix", nierozpuszczonych lub rozpuszczonych w heksanie (przechowywanych zgodnie z instrukcjami producenta). Określenie profilu kwasów tłuszczowych zostało przeprowadzone w akredytowanym laboratorium (Certyfikat Akredytacji PCA nr AB 439 Wydanie nr 18 z dnia 2 sierpnia 2019 r.).

3.1.8. Analiza ultrastruktury mięśnia piersiowego i wątroby kurcząt

Natychmiast po uboju, resekcję dystalnej części lewego płata wątroby i fragment mięśnia piersiowego (n=10 na grupę) pocięto na kawałki o odpowiedniej wielkości (2 mm³) i utrwalono przez zanurzenie w buforowanym 3% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylowym (pH 7,2) przez co najmniej 2 godziny w temperaturze 4°C. Próbkę tkanek zostały następnie utrwalone w 2% tetratlenku osmu w buforze kakodylanowym (pH 7,2) przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Odwodnienie

utrwalonych tkanek przeprowadzono przy użyciu rosnącej serii etanolu, a następnie przeniesiono do żywicy epoksydowej za pomocą tlenu propylenu (Marzella i Glaumann, 1980). Na koniec próbki wątroby (n=10) zatopiono w mieszaninie DDSA/NMA/Embed-812 (Agar Scientific Ltd). Ultracienkie skrawki (40-60 nm) wycięto na ultramikrotomie Reichert-Jung i podwójnie wybarwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Ocenę ultrastruktury przeprowadzono przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tesla BS-500 z kamerą Frame Transfer-1K-CCD (TRS, Niemcy). Odsetek nieprawidłowych mitochondriów oszacowano na każdym obrazie TEM poprzez zliczenie 500 losowo wybranych mitochondriów.

3.1.9. Deklaracja etyczna

Wszystkie procedury w niniejszym badaniu zostały przeprowadzone zgodnie z prawem obowiązującym na terenie Unii Europejskiej i polskiej ustawy o ochronie zwierząt (Dz.U. 1997 nr 111 poz. 724). Nie stosowano żadnych działań wiążących się z ich bólem lub cierpieniem. Przestrzegano wszystkich obowiązujących wytycznych instytucjonalnych dotyczących opieki nad zwierzętami. Procedury eksperymentalne przeprowadzone w tym badaniu zostały zatwierdzone przez II. Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

3.1.10. Analiza statystyczna

Średnie wartości parametrów analizowano przy wykorzystaniu pakietu statystycznego PS IMAGO PRO 9.0, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Rozkład normalny danych weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji sprawdzono przy użyciu testu Levene'a. Test Tukey'a wykorzystano do określenia istotności różnic między badanymi grupami (*post-hoc*). W przypadku porównania dwóch grup wykorzystano test t-Studenta przy spełnieniu założeń dla testów parametrycznych. Wyniki uznawano za istotnie statystycznie, gdy związane były z prawdopodobieństwem mniejszym niż 5%. Wyniki z prawdopodobieństwem mniejszym niż 1% uznawano za wysoce istotne.

3.2. Doświadczenie II: Określenie wpływu ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g podanego do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego poprzez podanie *per os* subklinicznych dawek *Clostridium perfringens* i lipopolisacharydu z bakterii *E. Coli* na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

3.2.1. Skład chemiczny ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu

Wiechy konopi (*Cannabis sativa* L.) zostały zebrane w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych w Poznaniu. Materiał roślinny został pocięty i wysuszony w temperaturze pokojowej. Ekstrakt nadkrytyczny dwutlenku węgla z konopi uzyskano w Zakładzie Ekstrakcji Nadkrytycznej Instytutu Nowych Syntez Chemicznych w Puławach. Parametry ekstrakcji były następujące: ciśnienie 250 barów; temperatura 60 °C; natężenie przepływu 40 kg CO₂/1 kg zużytych konopi. Po procesie odparowania ekstrakt z konopi zawierał 12% kannabidiolu, 0,49% tetrahydrokannabinolu i 0,38% kwasu tetrahydrokannabinolowego, jak określono za pomocą HPLC (Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Leczniczych, Poznań, Polska).

3.2.2. Kurczęta brojlery i mieszanki paszowe zastosowane w ich żywieniu

Doświadczenie przeprowadzono na 204 kogutkach linii Ross 308 losowo przydzielonych do sześciu grup doświadczalnych - po 34 ptaki w każdej grupie (schemat 2.). Kogutki były odchowywane przez 35 dni. Ptaki miały swobodny dostęp do wody i zachowany cykl świetlny (Aviagen, 2019). Kogutki żywiono mieszankami pełnoporcjowymi typu starter (1-7 dnia) i grower (8-35 dnia). W każdej grupie zastosowano tę samą pełnoporcjową mieszankę paszową (tabela 2.).

3.2.3. Grupy doświadczalne i indukowany stan zapalny

Grupy doświadczalne:

- **CON** - grupa kontrolna;
- **CON+CBD** - jak CON, ale z dodatkiem ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu do paszy (30 g/1000 g);
- **CH1** - jak CON, ale z podaniem *per os* *C. perfringens*;
- **CH2** - jak CON, ale z podaniem *per os* lipopolisacharydu *E. coli*;

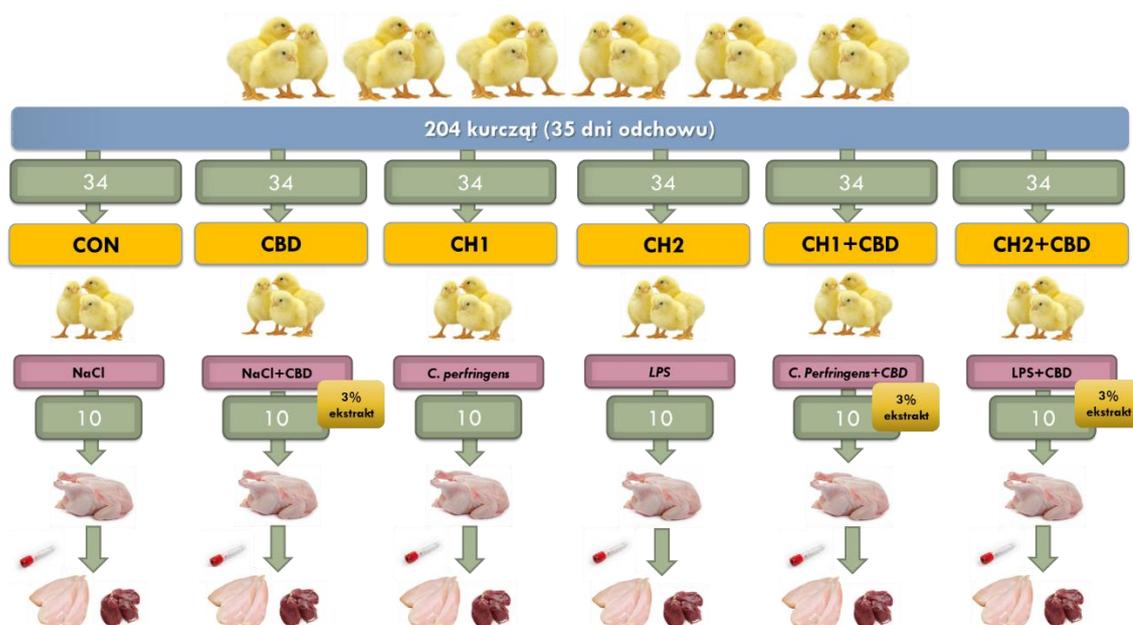
- **CH1+CBD:** *C. perfringens* + ekstrakt z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu do paszy (30 g/1000 g);
- **CH2+CBD:** LPS (*E. coli*) + ekstrakt z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu do paszy (30 g/1000 g).

Tabela 2. Skład pełnoporcjowej mieszanki paszowej

Składniki g/kg paszy	Starter 1–7 d.	Grower 8–35 d.	Składniki analityczne	Starter 1–7 d.	Grower 8–35 d.
Kukurydza	200,0	200,0	ME (kcal/kg)	2900	3000
Śruta poekst. sojowa	306,9	270,0	Białko ogólne (g/kg)	22,0	20,5
Pszenica	432,0	463,0	Włókno surowe (g/kg)	2,72	2,70
Tłuszcz	20,10	31,50	Tłuszcz surowy (g/kg)	4,00	5,20
Ronozym ¹	0,20	0,10	Popiół ogólny (g/kg)	2,70	2,50
Sól	3,30	3,10	Lizyna (g/kg)	1,40	1,20
Kreda pastewna	15,40	14,0	Metionina (g/kg)	0,60	0,60
fosforan jednowapniowy	10,80	8,60	Met. + Cys (g/kg)	1,00	0,90
Chlorek choliny	1,00	1,00	Treonina (g/kg)	0,90	0,80
DL-Metionina	3,00	2,60	Wapń (g/kg)	0,90	0,90
L-Lizyna	3,70	2,80	Fosfor dostępny (g/kg)	0,40	0,40
L-Treonina	1,10	0,80			
Premiks wit.-min. ²	2,50	2,50			

¹Ronozym WX (Novozymes, Kopenhaga, Dania); ²IU na kg paszy: wit. A, 10 000; wit. D3, 4500; mg: wit. E, 80; wit. B₁, 1,5; wit. B₂, 5; biotyna, 0,12; wit. B₆, 2,5; wit. B₁₂, 0,02; wit. K., 33; kwas nikotynowy, 50; kwas foliowy, 1,1; kwas pantotenowy, 14; cholina, 200; betaina, 160; Mn, 120; Zn, 100; Se, 0,35; Cu, 20; Fe, 40; J., 3; i Ca, 0,6.

W 21 i 22 dniu życia kogutki były ważone indywidualnie po 4 godzinach od zakończenia zadawania paszy. Następnie ptakom z grup CH2 podano *per os* LPS (*E. coli*, serotyp O55:B5; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) odtworzony w 0,9% jałowym roztworze soli fizjologicznej (0,5 mg/ml) w dawce 1 ml zawierającej 250 µg/kg masy ciała LPS (Konieczka i in., 2019). W tym samym czasie (dzień 21 i 22) ptaki z grup CH1 zostały zainfekowane (*per os*) 1 ml inokulum (pożywka do infuzji mózg-serce) zawierającym około 10⁸ CFU/ml bakterii *C. perfringens*, typ A, szczep 56 zgodnie z wcześniej zatwierdzonym protokołem (Konieczka i in., 2020). Bakterie *C. perfringens* uzyskano od zakażonych kurcząt w Belgii. Zastosowany szczep został analitycznie potwierdzony jako α-toksyna i toksyna NetB-dodatni oraz β-toksyna i enterotoksyna-ujemny, zgodnie z deklaracją dostawcy (Ghent University, Merelbeke, Belgia). Ptakom w grupach CON i CON + CBD podawano taką samą dawkę sterylnej soli fizjologicznej.



Schemat 2. Układ przeprowadzonego doświadczenia z zastosowaniem dodatku ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu do paszy

3.2.4. Uboj i pobieranie prób do dalszych analiz

Do uboju wybrano 60 kogutków (po 10 ptaków z każdej grupy) w wieku 35 dni, których masa ciała była zbliżona do średniej masy ciała dla poszczególnej grupy badawczej. Po uboju próbki mięśnia piersiowego, wątroby i surowicy krwi pobrano do analiz: składu chemicznego, parametrów fizykochemicznych, biochemicznych i potencjału oksydacyjnego.

3.2.5. Ocena wydajności rzeźnej, składu chemicznego mięśnia piersiowego i wątroby oraz właściwości fizykochemicznych mięśnia piersiowego

Po uboju i schłodzeniu tuszek oceniono wydajność rzeźną kurcząt oraz określono procentowy udział mięśnia piersiowego, nóg i podrobów względem końcowej masy ciała (Michalczuk i in., 2016). Dla próbek mięśnia piersiowego oznaczono podstawowy skład chemiczny: suchą masę, tłuszcz surowy, białko ogólne w tym kolagen oraz popiół ogólny. Oznaczenia wykonano metodą NIR (Michalczuk i in., 2016). pH zmierzono 24 godziny po uboju wykorzystując pH-metr CP-411 z elektrodą szklaną (Elmetron, Zabrze, Polska). Określono parametry barwy mięsa 24 godziny po uboju przy użyciu kolorymetru CR-410 (Minolta Ca. Ltd., Osaka, Japonia), gdzie każdy pomiar powtarzano dwukrotnie. Uzyskane wartości reprezentowały skalę jasności (parametr L_{24}^*) oraz stopień wysycenia barwą czerwoną (parametr a_{24}^*) i żółtą (parametr b_{24}^*) (Michalczuk i in., 2017). Wyciek

swobodny określono na podstawie różnicy mas mięśnia piersiowego po 24 godzinach chłodzenia w temp. 4 °C.

3.2.6. Oznaczenie kolagenu typu III w mięśniu piersiowym, wątrobie i surowicy krwi

Oznaczanie kolagenu typu III przeprowadzono przy użyciu zestawu Chicken Collagen Type 3 ELISA Kit firmy Bioassay Technology Laboratory (nr kat. E0314Ch) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

3.2.7. Profil kwasów tłuszczowych mięśnia piersiowego i wątroby

Tłuszcz z mięśnia piersiowego i wątroby ekstrahowano a profil kwasów tłuszczowych oznaczono zgodnie z metodyką opisaną w niniejszej pracy w punkcie 3.1.7.

3.2.8. Analiza biochemiczna surowicy krwi

Parametry biochemiczne krwi oznaczono metodami: ALT (aminotransferaza alaninowa) - zmodyfikowana IFCC, TRIS, bez P5P; α -amylaza - CNPG 3 - enzymatyczna; ALP (fosfataza alkaliczna) - PNPP z AMP jako buforem; AST (aminotransferaza asparaginianowa) - zmodyfikowana IFCC, TRIS, bez P5P; TP (białko całkowite) - metoda biuretowa; TCh (cholesterol całkowity) - enzymatyczna produkcja H₂O₂; CK (kinaza kreatyninowa) - aktywowana NAC; GLDH (dehydrogenaza glutaminianowa) - bufor trietanolaminowy; GGTP (gamma-GT, aminotransferaza) - standard IFCC; UA (kwas moczowy) - urykaza; LDH (dehydrogenaza mleczanowa) - mleczan-pirogronian; TTG (trójglicerydy) - metoda enzymatyczna; BA (kwas żółciowy) - diazo-(J-G) w/blank; InP (fosfor nieorganiczny) - fosfomolibdenian - UV; K (potas) - ISE-rozcieńczony; Na (sód) - SE-rozcieńczony; Fe (żelazo) - TPTZ [2,4,6-tri-(2-pirydylo)-5-triazyna]. Próbki krwi pobierano do sterylnych probówek bez antykoagulantu. W celu uzyskania surowicy, krew pełną odwirowywano z prędkością 2000 obrotów przez 10 minut w temperaturze 4 °C, a następnie umieszczano w statywach analizatora.

3.2.9. Właściwości przeciwutleniające mięśnia piersiowego i wątroby

Oznaczenie właściwości przeciwutleniających w mięśniu piersiowym i wątrobie kogutków wykonano zgodnie z metodyką podaną w niniejszej pracy w punkcie 3.1.6.

3.2.10. Deklaracja etyczna

Wszystkie procedury w niniejszym badaniu zostały ocenione i zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyki i Opieki nad Zwierzętami w Olsztynie (UWM), Polska (uchwała nr 3/2021) i zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami UE (zalecenie 2007/526/CE) i polską ustawą o ochronie zwierząt (Dz.U. 1997 nr 111 poz. 724).

3.2.11. Analiza statystyczna

Rozkład normlany danych został sprawdzony za pomocą testu Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji sprawdzono za pomocą testu Levene'a. Wpływ efektów głównych CBD (dodatek ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu w paszy) oraz CH (indukowany stan zapalny) i interakcji CBDxCH analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji MANOVA, a następnie testem *post-hoc* Bonferroniego dla porównań parami, w stosownych przypadkach.

Wyniki uznano za statystycznie istotne, gdy wiązały się z prawdopodobieństwem niższym niż 5%. Wyniki o prawdopodobieństwie niższym niż 1% uznano za wysoce istotne. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu programu PS IMAGO PRO 9.0 dla systemu Windows.

4. Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych

4.1.1. Doświadczenie I: Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens (Bień i in., 2023)

Na podstawie badań własnych nie stwierdzono ($p > 0,05$) negatywnego wpływu różnych form Se do paszy w ilości 0,5 mg/1000 g na wyniki odchowu kurcząt. W badaniu przeprowadzonym przez Ahmad i in. (2012) stwierdzono, że zastosowanie Se w ilości 0,4 mg/kg paszy w postaci drożdży selenowych lub nano-Se były w stanie pokryć zapotrzebowanie ptaków na ten pierwiastek i zapewnić optymalne wyniki odchowu. Selen wpływa na odchow kurcząt, co jest związane z ekspresją selenoproteiny P i selenoenzymów typu I, które odgrywają kluczową rolę w syntezie hormonów tarczycy i transporcie Se, a te przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania i wzrostu organizmów ptaków (Zhan i in., 2014).

Zastosowanie różnych dodatków Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy, podobnie jak w przypadku wyników odchowu, nie miało negatywnego wpływu ($p > 0,05$) na wyniki analizy rzeźnej tuszek kurcząt brojlerów. Nie stwierdzono ($p > 0,05$) różnic dla wydajności rzeźnej i udziału mięśnia piersiowego w masie ciała pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi. Payne i Southern (2005), w doświadczeniu przeprowadzonym na kurczętach żywionych dodatkiem selenianu sodu i drożdży selenowych do paszy, stwierdzili, że wydajność rzeźna nie zależała od formy Se podanej do paszy. Downs i in. (2000) stwierdzili podobną zależność w swoim badaniu dotyczącym stosowania drożdży selenowych w żywieniu kurcząt. Poprzednie badania potwierdzają wyniki z badania własnego.

Największą koncentrację Se stwierdzono ($p < 0,001$) w mięśni piersiowym kogutków T2 (drożdże selenowe), podczas gdy największą koncentrację Se w wątrobie stwierdzono ($p < 0,001$) w grupie CON (0,3 mg/1000 g). Odmiennego zdania byli Chen i in. (2014). Organiczna forma Se (selenometionina) jest absorbowana i odkładana w tkankach bardziej efektywnie niż nieorganiczne formy selenu (Sevcikova i in., 2006; Skřivan i in., 2008) jest to związane z różnicami w szlakach metabolicznych między nieorganicznymi i organicznymi formami Se. Nieorganiczny Se jest wchłaniany przez nabłonek jelita poprzez transport bierny, a organiczny Se na drodze transportu aktywnego

(Skřivan i in., 2008). Se dostarczony w formie nieorganicznej jest szybko wchłonięty przez czerwone krwinki i za pomocą glutationu zredukowany do selenku, który z kolei jest transportowany w plazmie krwi, selektywnie wiązany z albuminami i przekazany do wątroby (Batorska, 2013). Z kolei selenian sodu (forma nieorganiczna) może być wprost wchłonięty do wątroby lub wydalony z moczem (Dumont i in., 2006; Batorska, 2013). Selen w formie nanocząstek dodawany w ilości 0,5 mg/1000 g do paszy dla kurcząt brojlerów może być bezpiecznie stosowany. Badania własne wykazały, że stosowanie nano-Se nie prowadzi do nadmiernego kumulowania się tego pierwiastka w wątrobie kurcząt w przeciwieństwie do formy nieorganicznej (selenian sodu). Produkty pochodzenia zwierzęcego o zwiększonej koncentracji Se można uzyskać poprzez odpowiednie żywienie drożdżami selenowymi lub nano-Se w ilości 0,5 mg/1000 g. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badanie potwierdza, że dodatek do paszy dla kurcząt nano-Se jest bezpieczny i może stanowić cenne źródło Se w diecie człowieka.

Zmiany po uboju prowadzą do akumulacji kwasu mlekowego w mięśniach, co bezpośrednio wpływa do obniżenia pH. Obniżenie pH po uboju powoduje zmniejszoną denaturacją białek, a to przekłada się na lepszą zdolność mięśni szkieletowych do zatrzymywania soku mięśniowego (Berri i in., 2007). W badaniach własnych stwierdzono istotny wpływ ($p < 0,001$) stosowania Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy na pH₂₄. Mięśnie piersiowe kogutków, u których w żywieniu zastosowano dodatek selenianu sodu w ilości 0,5 mg/1000 g paszy (T1), miały najniższe pH₂₄, tym samym większy wyciek swobodny (3,01%) i wartość wskaźnika WHC (3,11 cm²/g), podczas gdy istotnych różnic nie stwierdzono ($p > 0,05$) między CON, T2 i T3. Stosowanie innych form Se do paszy (drożdże selenowe i nano-Se) w żywieniu kurcząt brojlerów w porównaniu z selenianem sodu w zwiększonej ilości ma pozytywny wpływ na właściwości fizykochemiczne związane z utrzymaniem wody własnej w mięśniu piersiowym. Barwa mięsa zależy od wielu czynników m.in. od pH, stężenia mioglobiny, azotynów (King i Whyte, 2006). Se może znacznie poprawić aktywność peroksydazy glutationowej w surowicy krwi, zwiększyć odporność na utlenianie mioglobiny lub oksymioglobiny i pogłębić barwę mięsa (Cai i in., 2012; Oliveira i in., 2014). W badaniu własnym selenian sodu był zastosowany w ilości 0,5 mg/1000 g paszy zwiększając ($p < 0,001$) jasność (L₂₄*) i wysycenie ($p < 0,001$) barwą żółtą (b₂₄*), które bezpośrednio wpływają na wizualną ocenę mięśnia piersiowego przez konsumenta (ΔE).

W badaniach własnych obrazy ultrastrukturalne wykazały istotne zmiany ($p \leq 0,01$) we włóknach mięśniowych (mięsień piersiowy) kurcząt brojlerów po zastosowaniu nieorganicznej formy Se (selenian sodu) w ilości 0,5 mg/1000 g paszy. Stwierdzono zmianę profilu miofibrili oraz uszkodzenie sarkomerów i mitochondriów. Ponadto na podstawie przeprowadzonych pomiarów długości sarkomerów stwierdzono ($p \leq 0,01$) zmniejszenie długości do 1,64 μm (T1), co może skutkować zmniejszoną elastycznością włókien mięśniowych. Długość sarkomerów, kurczliwych jednostek mięśnia prążkowanego, wpływa na elastyczność mięśnia. Badania sugerują, że naprężenie sarkomerów i długość tityny (białko mięśni poprzecznie prążkowanych łączy filamenty miozynowe z linią Z, umieszczając tym samym miozynę w centrum sarkomeru) wpływają na boczną sztywność strefy nakładania się aktyny i miozyny, co ma wpływ na elastyczność mięśnia (Li i in., 2016; Lichtwark i in., 2018). Zaobserwowane zmiany mogą być spowodowane słabszym wychwytem Se, który trudniej wiąże się z peroksydazą glutationową, odpowiedzialną za usuwanie reaktywnych form tlenu i zapobieganie stresowi oksydacyjnemu (Huang i in., 2014; Zhang i in., 2020a; Liu i in., 2021). Natomiast kurczęta, którym podawano Se w formie organicznej (drożdże selenowe) i nano-Se wykazywały nieco inny obraz zmian ultrastrukturalnych. W obu przypadkach obserwowano stabilną strukturę miofibrili z sarkomerami o regularnym profilu włókien aktyny i miozyny. Nie obserwowano zmian w strukturze mitochondriów. Jednak pomiary długości sarkomerów wykazały ($p \leq 0,01$) wzrost długości do 1,79 μm po zastosowaniu drożdży selenowych i wzrost do 1,81 μm po zastosowaniu nano-Se, odwrotnie niż w grupie z Se w formie nieorganicznej (selenian sodu). Według danych Ertbjerg i Puolanne (2017) długość sarkomerów może wpłynąć na lepszą elastyczność tkanki mięśniowej, a tym samym na jakość mięsa kurcząt brojlerów.

Celem określenia wpływu różnych form Se na ultrastrukturę hepatocytów, ultracienkie skrawki wątroby kurcząt ze wszystkich grup (CON, T1, T2, T3) analizowano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Badanie to wykazało, że głównym efektem działania Se na poziomie ultrastrukturalnym wątroby było pojawienie się skupisk gęstych elektronowo (osmofilnych) inkluzji w obrębie macierzy mitochondrialnej. Te zmiany patologiczne obserwowano głównie w hepatocytach kurcząt z grupy T1 i w niewielkim stopniu w mitochondriach kurcząt żywionych paszą CON. Prawie wszystkie mitochondria w hepatocytach kurcząt z grupy T1 wykazywały różny stopień zwyrodnienia hydropatycznego. Były nabrzmięte i miały uszkodzone błony

wewnętrzne. Inkluzje znalezione w macierzy mitochondrialnej były przezroczyste z powodu napływu wody. Obfite, kuliste, gęste elektronowo złożone w macierzy mitochondrialnej zaobserwowano w licznych mitochondriach kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 0,5 mg/1000 g selenianu sodu (T1). Mitochondria zniekształcone stanowiły 91,83% całkowitej ich liczby. Mitochondria hepatocytów kurcząt z grupy T1 wykazywały cechy toksycznej odpowiedzi na zbyt wysoki udział dodatku selenu nieorganicznego w paszy. Efektem zmian objętości macierzy jest stymulacja łańcucha transferu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej dla zaspokojenia potrzeb metabolicznych komórki. Jednak nadmierny obrzęk macierzy zmianami przepuszczalności mitochondriów PTP (kanał o wysokiej przewodności) i innymi mechanizmami niezależnymi od PTP powoduje, że funkcje i integralność mitochondriów są mniej wydajne i prowadzą do śmierci komórki. Zwraca uwagę jednocześnie pojawienie się uszkodzonych mitochondriów i wakuoli autofagicznych, a także zmniejszenie liczby pierwotnych lizosomów w hepatocytach kurcząt żywionych zwiększoną ilością nieorganicznego Se (selenian sodu, 0,5 mg/1000 g paszy). W hepatocytach kurcząt żywionych paszą z dodatkiem Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy (T2 i T3), w przeciwieństwie do grupy T1, tylko niektóre mitochondria były nabrzmiałe (odpowiednio 25,43% i 26,96% całkowitej ilości w komórce). Pojawiły się natomiast liczne pierwotne lizosomy. Podsumowując, w grupach kurcząt (CON, T2 i T3), w przeciwieństwie do grupy T1, nie obserwowano zmian patologicznych w ultrastrukturze hepatocytów, zarówno w odniesieniu do mitochondriów, jak i innych organelli.

Równoległe z analizą morfologiczną oceniano aktywność enzymów degradujących (AlaAP, LeuAP, ArgAP, AcP, BGDR, BGAL, HEX, aGlu i MAN). W wątrobie kurcząt, w żywieniu których mieszanka pełnoporcjowa zawierała dodatek 0,5 mg selenianu sodu/1000 g paszy obserwowano spadek aktywności analizowanych enzymów. Były one zaangażowane w procesy trawienia wewnątrzkomórkowego, o czym świadczy obecność wakuoli autofagicznych i wyczerpanie pierwotnych lizosomów, które są komórkowym rezerwuarem hydrolaz kwaśnych. Natomiast stwierdzono ($p \leq 0,05$), wzrost aktywności analizowanych enzymów w wątrobie w pozostałych dwóch grupach (T2 i T3), wskazując na obniżenie poziomu degradacji lizosomalnej. Ultrastruktura hepatocytów obu grup wykazała liczne pierwotne lizosomy, prawdopodobnie z powodu niskiego zużycia lizosomów. Spadek aktywności enzymów w grupie T1 może wskazywać

na wzrost degradacji organelli uszkodzonych przez nadmierną podaż nieorganicznego Se do paszy. Według Marzella i in. (1982) aktywność enzymu początkowo wzrasta równoległe z indukcją degradacji, ale później opada wraz z zaawansowaniem degradacji sekwestrowanych organelli komórkowych. Dysfunkcja mitochondriów jest istotnym objawem w patogenezie różnych chorób. Badania własne potwierdziły, że mitochondria narażone na zbyt wysokie poziomy Se nieorganicznego w paszy, ulegają zmianom strukturalnym i funkcjonalnym (Medina i in., 1983; Meyer i in., 2013; Zahedi i in., 2018; Liu i in., 2020).

Wpływ Se na właściwości przeciwutleniające w mięśniu piersiowym i wątrobie kurcząt brojlerów określono oznaczając w nich zawartość witaminy C i glutationu (GSH) oraz zdolność do redukcji wolnego rodnika DPPH. Obie grupy kurcząt (T2 i T3) charakteryzowały się istotnie wyższym ($p \leq 0,01$) stężeniem witaminy C, wskaźnikiem DPPH i zawartością glutationu w mięśniach i wątrobie niż w grupie kontrolnej (CON). Wzrost właściwości przeciwutleniających w mięśniu piersiowym i wątrobie kurcząt otrzymujących do paszy dodatek seleno organicznego wskazuje na lepszą stabilność oksydacyjną organizmu, w przeciwieństwie do grupy T1, gdzie stwierdzono gorsze właściwości antyoksydacyjne. W surowicy krwi stwierdzono ($p \leq 0,05$) największe stężenie witaminy C i GSH w grupie T3. Podobnie Visha i in. (2017) stwierdzili, że kurczęta żywione formami nano- i organicznym Se wykazywały wyższą całkowitą zdolność antyoksydacyjną w surowicy krwi i tkankach w porównaniu do grupy żywionej nieorganiczną formą Se. Selen odgrywa istotną rolę w ochronie komórek przed uszkodzeniem oksydacyjnym poprzez wpływ na poziom przeciwutleniaczy i aktywność selenoenzymów (Bai i in., 2017). Selen w formie nanocząstek jest zdolny do wychwytywania wolnych rodników poprzez wzrost aktywności selenoenzymów (Sarkar i in., 2011; Bai i in., 2017) oraz poprawę statusu utleniaczy w surowicy i retencją seleno *in vivo*. W porównaniu z innymi formami seleno, takimi jak SeMet, SeCys i drożdże selenowe, nano-Se charakteryzowały się niższą toksycznością i zwiększały aktywność selenoenzymów. Działanie przeciwutleniające nano-Se jest związane głównie z rodziną peroksydaz glutationowych (GPX) i reduktazą tioredoksyny (TR). GPX mają zdolność do detoksykacji szerokiego zakresu nadtlenuków, takich jak H_2O_2 , wodoronadtlenek fosfolipidów, wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych i grupy hydroperoksydowe tyminy (Kondaparthi i in., 2019). Podsumowując, w badaniu własnym wykazano, że stosowanie dodatku nano-Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy może być

skuteczne w zwiększaniu potencjału antyoksydacyjnego u kurcząt, zwiększając tym samym zdolność do detoksykacji szerokiego zakresu nadtlenków.

Wyniki badań własnych wykazały, że stosowanie dodatku różnych form Se w ilości 0,3-0,5 mg/1000 g paszy dla kurcząt brojlerów nie miało negatywnego wpływu na właściwości fizykochemiczne mięśnia piersiowego, potencjał antyoksydacyjny oraz ultrastrukturę mięśnia piersiowego i wątroby. Poprawie uległy parametry jakościowe mięśnia piersiowego, takie jak długość sarkomerów, co skutkowało lepszą elastycznością tkanki mięśniowej i jakością mięsa. Potwierdzono, że stosowanie nano-Se w zwiększonej ilości (0,5 mg/1000 g paszy) chroni przed uszkodzeniem mitochondriów w hepatocytach i zwiększa potencjał antyoksydacyjny. Dodatek selenu do paszy kurcząt brojlerów w formie nanocząstek w ilości 0,5 mg/1000 g paszy charakteryzował się dobrą biodostępnością oraz niską toksycznością bez negatywnego wpływu na wydajność wzrostu kurcząt.

4.1.2. Doświadczenie I: Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens (Bień i in., 2022)

Porcja 100 g mięśni piersiowych kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 0,5 mg/1000 g nano-Se pokrywa 17% zalecanego dziennego spożycia selenu (RDI Se = 70 µg/dzień) dla dorosłego człowieka (Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium, 2014). Spożycie 100 g mięśni piersiowych kurcząt otrzymujących dodatek drożdży selenowych (T2) zapewnia do 60% RDI. Koncentracja selenu w wątrobie jest wyższa niż w mięśniach. Wątroby kurcząt z grup CON, T1 miały wyższy poziom Se niż zalecany RDI w przeliczeniu na 100 g wątroby. Wątroby kogutków z grupy T2 mogą dostarczyć do 70% RDI tego pierwiastka (w 100 g tkanki). Mięso drobiowe pozyskane od kurcząt żywionych paszą z dodatkiem selenu organicznego (T2) oraz nano-Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy może być zaliczane do żywności funkcjonalnej. Nano-Se są cennym i bezpiecznym źródłem Se w diecie konsumentów. Wyniki badań własnych wskazują, że organiczne formy Se (drożdże selenowe) dodane do paszy dla kurcząt zapewniają im prawidłowy wzrost i stan zdrowia. Stosowanie zwiększonych dawek Se w żywieniu kurcząt brojlerów (0,5 mg/1000 g paszy) jest dozwolone przez przepisy Unii Europejskiej (Dyrektywa Komisji z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych), przynosząc obopólne korzyści producentom, przemysłowi przetwórczemu i konsumentom. Ponadto, nano-Se mogą być skuteczne w modulowaniu profilu kwasów tłuszczowych mięsa i podrobów kurcząt brojlerów. W badaniu przeprowadzonym przez Kralik i in. (2012) zastosowano dodatek drożdży selenowych do paszy w ilości 0,5 mg/1000 g i stwierdzono, że mięso od tych kurcząt charakteryzowało się większą koncentracją Se i kwasów tłuszczowych n-3. W badaniu własnym grupa T2 (drożdże selenowe) charakteryzowała się istotnie ($p < 0,001$) najwyższym stężeniem Se w mięśni piersiowym (0,42 mg/kg) i istotnie ($p < 0,001$) niższą koncentracją kwasów tłuszczowych n-3 (1,54 g/100 g) względem grupy CON. Z badań własnych wynika, że żywienie kurcząt brojlerów paszą ze zwiększoną ilością selenianu sodu (0,5 mg/kg paszy) pozwala osiągnąć ($p < 0,001$) najlepszą proporcję kwasów n-6/n-3 oraz najwyższą koncentrację kwasu linolenowego (ALA) w mięśni piersiowym.

Zastosowanie w żywieniu kurcząt dodatku selenianu sodu w ilości 0,3 mg/1000 g paszy obniżyło koncentrację kwasów tłuszczowych C14:0 i C16:0 (kwasy mirystynowy i palmitynowy) w mięśni piersiowym i wątrobie względem grup T2 i T3. Uzyskane

wyniki z badań własnych są istotne z punktu widzenia diety człowieka, ponieważ te kwasy tłuszczowe (SFA) mogą być potencjalnymi promotorami chorób sercowo-naczyniowych (Praagman i in., 2016). Żywienie kurcząt brojlerów paszą z dodatkiem selenianu sodu (0,3-0,5 mg/1000 g paszy) wpłynęło ($p < 0,001$) na zwiększoną koncentrację kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 PUFA w mięśni piersiowym. Zależność tę można wyjaśnić większą ochroną zapewnioną przez nieorganiczne źródło Se w paszy, a tym samym zmniejszoną degradacją PUFA (Betti i in., 2009). Zwiększoną ochronę PUFA można przypisać aktywności peroksydaz glutationowych. Są to enzymy, których główną funkcją jest rozkładanie H_2O_2 i nadtlenków organicznych (ROOH) do wody i odpowiedniego alkoholu (ROH) przy udziale zredukowanego glutationu (GSH). Rozkładając nadtlenki enzymy chronią erytrocyty przed hemolizą a składniki błon komórkowych przed uszkodzeniem ich struktur przez wolne rodniki (Batorska, 2013). Selen jest ważnym składnikiem peroksydazy glutationowej a dodatek Se do paszy może zwiększać ekspresję mRNA GSH-Px1 w wątrobie kurcząt (Yuan i in., 2012). W badaniu własnym stwierdzono, że Se stosowany w postaci drożdży selenowych i nano-Se do paszy w żywieniu kurcząt wpłynął na zwiększenie ($p < 0,001$) koncentracji PUFA w mięśni piersiowym a zmniejszył ją w wątrobie. Jest to związane z różnymi funkcjami mięśnia piersiowego i wątroby. Mięsień piersiowy gromadzi PUFA głównie w lipidach, podczas gdy wątroba jest odpowiedzialna za ich dystrybucję w organizmie. Zwiększony poziom PUFA w paszy, zwłaszcza n-3 PUFA, może prowadzić do peroksydacji lipidów, a w konsekwencji do upośledzenia funkcji wątroby (Konieczka i in., 2017).

W badaniu własnym stwierdzono, że stosowanie selenianu sodu do paszy (0,5 mg/1000 g) modyfikuje ($p < 0,001$) profil kwasów tłuszczowych mięśnia piersiowego w kierunku bardziej korzystnego stosunku n-6/n-3, co jest zalecane w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych (Del Gobbo i in., 2016). Zaburzony stosunek n-6/n-3 prowadzi do nadprodukcji prozapalnych eikozanoidów, które stymulują syntezę cytokin i białek ostrej fazy. Białka te są czynnikami przyczyniającymi się do rozwoju takich chorób jak nowotwory, choroby układu krążenia, miażdżyca, otyłość, cukrzyca typu II, czy choroba Alzheimera (Calder, 2006; Hotamisligil, 2006). Kwasy laurynowy (C12:0), mirystynowy (C14:0) i palmitynowy (C16:0) silnie korelują z ryzykiem wystąpienia miażdżycy, otyłości czy choroby niedokrwiennej serca (Ulbricht i Southgate, 1991; Haug in., 2007), zaś stopień nasycenia kwasami C12:0, C14:0 i C16:0 uznawany jest za wskaźnik oceny jakości żywności (Legrand i Hermier, 1992). W badaniu własnym zastosowanie

w żywieniu kurcząt dodatku Se w postaci drożdży selenowych i nano-Se wpłynęło istotnie ($p < 0,001$) na zwiększenie koncentracji C:16:0, zaś nie wpłynęło ($p > 0,05$) na zwiększenie koncentracji kwasów C12:0 i C14:0 w mięśni piersiowym. Żywienie kurcząt paszą z dodatkiem selenianu sodu w ilości 0,3-0,5 mg/1000 g (CON i T1) istotnie zmniejszyło koncentrację nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) względem grup T2 i T3 w mięśni piersiowym. Zastosowanie dodatku selenianu sodu w ilości 0,3-0,5 mg/1000 g do paszy (CON i T1) wpłynęło na zwiększoną koncentrację kwasu linolenowego (ALA) w mięśni piersiowym, co jest istotne dla zdrowia konsumenta.

Wartości wskaźników aterogenności (AI) i trombogenności (IT) powinny być jak najniższe. Im niższe są ich wartości, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo wystąpienia miażdżycy i powstania zakrzepów krwi u człowieka (Donovan i in., 2000). W przeciwieństwie do wskaźników AI i TI wartości wskaźników hipocholesterolemii i hipercholesterolemii (h/H) muszą być jak najwyższe, aby chronić organizm człowieka przed hipercholesterolemią, która jest czynnikiem ryzyka zespołu miażdżycowego (Rafieian-Kopaei i in., 2014). W badaniu własnym stwierdzono, że zastosowanie różnych form Se do paszy w zwiększonej ilości (T1, T2 i T3) dla kurcząt wpłynęło na wzrost wskaźnika IA ($p < 0,001$) w mięśni piersiowym, natomiast na wzrost wskaźnika IT wpłynęło ($p < 0,001$) zastosowanie w żywieniu kurcząt selenianu sodu w ilości 0,5 mg/1000 g paszy. Wątroby kurcząt, charakteryzują się dużą koncentracją lipidów i minerałów wykazujących działanie prooksydacyjne. Zastosowanie dodatku selenianu sodu (0,3 mg/1000 g) i nano-Se (0,5 mg/1000 g) do paszy wpłynęło ($p = 0,011$) na zmniejszenie zawartości produktów utleniania lipidów w tkankach wątroby, odpowiednio 2,08 i 2,04 μg MDA/g względem T1. Dvorska i in. (2007) stwierdzili ochronny wpływ Se na tkankę wątroby przed zmianami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu. Stwierdzili, że dodatek do paszy nano-Se znacząco obniżył zawartość produktów utleniania lipidów, z 0,55 mg w grupie kontrolnej do 0,30 mg MDA/g w grupie eksperymentalnej. Zastosowanie w żywieniu kurcząt dodatku drożdży selenowych (T2) lub nano-Se (T3) wpłynęło istotnie ($p \leq 0,01$) na poprawę zdolności neutralizowania wolnych rodników (DPPH) oraz na zwiększoną koncentrację glutationu (GSH) w mięśni piersiowym, co odznacza się lepszym potencjałem antyoksydacyjnym względem grupy CON.

Desaturaza $\Delta 9$ (DI) katalizuje transformację średniołańcuchowych i długołańcuchowych SFA do jednonasyconych MUFA, czyli odpowiednio C16:0 i C18:0 do C16:1 i C18:1 (Reh i in., 2004). Aktywność desaturazy $\Delta 9$ zależy od żywienia i wieku ptaków (Poureslami i in., 2010), ale także od formy Se zawartej w paszy. W badaniu własnym stwierdzono wzrost aktywności desaturazy $\Delta 9$ ($p < 0,001$) w grupach żywionych paszą z dodatkiem 0,3 mg/1000 g selenianu sodu (CON). Transformacja średniołańcuchowych i długołańcuchowych SFA do jednonasyconych MUFA w mięśni piersiowym uzależnione jest nie tylko od aktywności desaturazy $\Delta 9$, lecz również od formy zastosowanego Se w paszy, co zostało potwierdzone. W badaniu własnym stwierdzono, że wartość desaturazy $\Delta 9$ była istotnie mniejsza ($p \leq 0,001$) w grupach T2 i T3 względem grupy CON, to koncentracja kwasu C16:1 była istotnie ($p < 0,001$) wyższa. Zawartość kwasu tłuszczowego C18:1 (cis-9) była istotnie ($p \leq 0,001$) mniejsza w grupach T2 i T3 względem grup gdzie zastosowano selen w formie selenianu sodu (CON i T1). Wartość wskaźnika $\Delta 5 + \Delta 6$ -desaturazy wskazuje na wyższą efektywność syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. W badaniu własnym stwierdzono większą ($p < 0,001$) koncentrację kwasu dokozaheksaenowego (DHA) w wątrobie kurcząt żywionych paszą z dodatkiem selenianu sodu w ilości 0,3 mg/1000 g paszy (CON). Koncentracja kwasu dokozaheksaenowego EPA nie różniła się istotnie ($p > 0,05$) pomiędzy próbkami mięśni piersiowych, natomiast istotne różnice ($p < 0,001$) stwierdzono pomiędzy próbkami wątrób. Zwiększoną koncentracją kwasów EPA i DHA w wątrobie, potwierdza istotnie wyższą aktywność $\Delta 5 + \Delta 6$ -desaturazy w grupach CON i T1. W badaniu własnym stwierdzono, że dodatek Se w postaci selenianu sodu miał wpływ na efektywność syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Badanie własne wykazało, że żywienie kurcząt dodatkiem selenu (selenian sodu) do paszy w ilości 0,3 mg/1000 g paszy istotnie wpłynęło na zwiększenie koncentracji selenu w wątrobie. Zastosowanie w żywieniu kurcząt drożdży selenowych (0,5 mg/1000 g paszy) wpłynęło na zwiększenie koncentracji Se w mięśni piersiowym. Zastosowanie w żywieniu kurcząt Se w formie nanocząstek w ilości 0,5 mg/1000 g paszy dla kurcząt charakteryzuje się istotnie wyższą zawartością PUFA i ochroną lipidów przed działaniem reaktywnych form tlenu. Stosowanie zwiększonych dawek selenu (0,5 mg/1000 g) do paszy dla kurcząt jest odpowiedzią na coraz szybsze tempo wzrostu i metabolizm organizmu kurcząt, i jest gwarantem zapewnienia konsumentom wysokiej jakości produktów pochodzenia zwierzęcego.

4.2. Doświadczenie II: Effects of Cannabis sativa extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide (Bień i in., 2024)

W dostępnej literaturze niewiele jest badań dotyczących stosowania ekstraktu z konopi włóknistych będącego źródłem kannabidiolu w żywieniu kurcząt i jego wpływu na wybrane parametry, takich jak wydajność rzeźną, czy na stan zdrowia kurcząt. Badania koncentrują się głównie na żywieniu kurcząt paszą z dodatkiem nasion konopi, które zawierają niewielkie ilości kannabidiolu w swoim składzie, ale także wiele innych składników (węglowodany, białka, witaminy (np. γ - tokoferol) i tłuszcze, niezbędne aminokwasy, błonnik, witaminy, minerały (Fe, Zn, Cu i Mn) i terpeny (Yu i in., 2005; della Rocca i Di Salvo, 2020; Rehman i in., 2021; Valizadehderakhshan i in., 2021). Wyniki odchowu kurcząt w badaniu własnym potwierdzają, że indukowanie stanu zapalnego drogą *per os* nie wpłynęło ($p > 0,05$) negatywnie na wyniki odchowu, w przeciwieństwie do rezultatów innych autorów (Chen i in., 2018; Gharib-Naseri i in., 2019), w których stosowano subkliniczną dawkę *Clostridium perfringens* i LPS. W badaniu własnym stwierdzono, że zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej w ilości 30 g/1000 g paszy, zwiększyło ($p < 0,001$) końcową masę ciała, co mogło być związane z lepszą smakowitością paszy i jej zwiększonym pobraniem (porównanie grup CON i CON+CBD). Sevcikova i in. (2006) stwierdzili, że zastosowanie w żywieniu kurcząt nasion konopi zwiększa masę ciała ptaków. Istnieją również doniesienia, że nasiona konopi nie wpływają negatywnie na współczynnik konwersji paszy (FCR) (Mahmoudi i in., 2015). W badaniu własnym wywołanie stanu zapalnego i podanie samego ekstraktu nie zwiększyło ($p > 0,05$) śmiertelności kurcząt. Potwierdza to brak negatywnego wpływu ekstraktu na stan zdrowia kurcząt przy zastosowaniu dawki subklinicznej (indukowany stan zapalny), która jak założono w doświadczeniu, nie zwiększy upadków kurcząt, a jedynie pogorszy wyniki ich odchowu.

Przeprowadzona dysekcja i ocena poubojowa wykazały, że zastosowanie dodatku ekstraktu z konopi siewnej do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego nie miało negatywnych skutków. Jedynie po podaniu 30 g/1000 g paszy badanego ekstraktu grupom, gdzie podano *per os* LPS stwierdzono niższy udział masy wątroby w stosunku do masy ciała u kogutków z grupy kontrolnej (w odniesieniu do efektu głównego indukowanego stanu zapalnego). Stan wiedzy na temat zmian masy wątroby u kurcząt

narażonych na działanie LPS wskazuje, że zmiany wywołane endotoksyną były już wielokrotnie obserwowane. Wiadomo, że zmiany masy wątroby spowodowane są wzrostem jej funkcji metabolicznych (Curtis i in., 1980; Xie i in., 2000; Mireles i in., 2005). Analizując inne badania, gdzie organizmy kurcząt były narażone na działanie LPS, lecz leczone berberyną o właściwościach podobnych do morfiny i kodeiny, stwierdzono również niższą masę wątroby w stosunku do masy ciała kurcząt (Shen i in., 2010). Potwierdzono, że kannabidiol wykazuje działanie synergistyczne z subanalgetycznymi dawkami morfiny w modelu ostrego bólu (Neelakantan i in., 2015). Względna masa wątroby może być dobrym wskaźnikiem wielkości odpowiedzi ostrej fazy, ponieważ wątroba jest miejscem syntezy białek ostrej fazy (Koj, 1996). Badania z wykorzystaniem innych gatunków zwierząt wykazały zwiększoną masę wątroby (makaki) i podwyższone enzymy wątrobowe (psy), gdy kannabidiol podawano w ilości 2 mg/kg masy ciała (Rosenkrantz i in., 1981; Gamble i in., 2018).

W badaniu własnym zastosowanie 30 g/1000 g dodatku ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu do paszy dla kurcząt wpłynęło istotnie ($p < 0,001$) na obniżenie pH₂₄ mięśni piersiowych u kogutków, którym podano subkliniczną dawkę *C. perfringens* (interakcja). W grupie, gdzie indukowano stan zapalny lipopolisacharydem (LPS) stwierdzono niewielki wzrost ($p \leq 0,05$) parametru L₂₄ mięśnia piersiowego po zastosowaniu dodatku ekstraktu z konopi siewnej (30 g/1000 g) do paszy, co kontrastuje z innymi podobnymi wynikami badań (Yang i in., 2010; Zhou i in., 2015). Dodanie samego ekstraktu z konopi siewnej (30 g/1000 g) do paszy nie zmienia parametrów barwy, co jest ważne, jeśli konsumenci są przyzwyczajeni do barwy produktu pochodzenia zwierzęcego.

Analiza składu chemicznego mięśni piersiowych i wątrób w badaniu własnym wykazała, że istotne ($p < 0,001$) interakcje między badanymi czynnikami (efekt główny zastosowania dodatku ekstraktu z konopi siewnej do paszy i efekt główny indukowanego stanu zapalnego) stwierdzono jedynie dla wątrób kogutków. Olkowski i in. (2008) wskazują, że łagodna infekcja *C. perfringens* lub indukowana przez LPS z *E. coli* może nie wpływać na zmiany w składzie chemicznym mięśnia piersiowego. W badaniu własnym jedynie w tkance wątroby stwierdzono istotnie ($p \leq 0,05$) większą zawartość popiołu ogólnego i mniejszą zawartość kolagenu, wody i tłuszczu surowego po podaniu ekstraktu z konopi do paszy (efekt główny zastosowania ekstraktu z konopi siewnej).

W grupie (CON+CBD), w której zastosowano dodatek ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu do paszy, stwierdzono zwiększony ($p \leq 0,05$) udział tłuszczu w wątrobie, co jest związane z samym podawaniem ekstraktu. Zawartość tłuszczu w wątrobach grup CH1 i CH2 pozostał taki sam. W badaniach Konieczki in. (2020) stężenie kannabidiolu w mięśniach piersiowych po podaniu do paszy 15 g/1000 g ekstraktu z konopi siewnej wynosiło $141,54 \pm 95,54$ ng/g (w przeliczeniu na suchą masę). Zawartość kolagenu w wątrobie zależała od tego, czy ekstrakt z konopi siewnej był stosowany do paszy, czy nie oraz od podania *per os* LPS kogutkom. Zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej do paszy istotnie ($p \leq 0,05$) zmniejszyło poziom całkowitego kolagenu w wątrobie kilkakrotnie (porównanie dla grup: CON i CON+CBD; CH2 i CH2+CBD). Poziom kolagenu typu III w surowicy uległ zmniejszeniu ($p \leq 0,05$) dopiero po podaniu ekstraktu z konopi siewnej (porównanie grup CON i CON+CBD), lecz gdy kurczęta były narażone na działanie *C. perfringens* i otrzymywały dodatek ekstraktu do paszy (CH1+CBD), to poziom kolagenu III w surowicy krwi uległ zwiększeniu ($p \leq 0,05$). Na podstawie tych spostrzeżeń można wywnioskować, że wzrost zawartości kolagenu typu III w surowicy jest związany z wywołanym stanem zapalnym w organizmach kurcząt. Zmniejszenie zawartości kolagenu w wątrobie może wskazywać, że ekstrakt z konopi siewnej ma działanie terapeutyczne na tkankę wątroby, zapewniając działanie ochronne przed indukowanym stanem zapalnym (LPS). W mięśniu piersiowym nie stwierdzono ($p > 0,05$), aby podanie badanego ekstraktu z konopi siewnej pogorszyło jakość mięśni piersiowych, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami Konieczki i in. (2022b). Podanie ekstraktu z konopi siewnej jako źródła kannabidiolu miało istotny ($p = 0,001$) wpływ na zmniejszenie koncentracji kolagenu ogólnego w mięśniu piersiowym.

Zainteresowanie konsumentów produktami pochodzenia zwierzęcego o wysokiej jakości prozdrowotnej doprowadziło do zwrócenia uwagi na modyfikowanie profilu kwasów tłuszczowych, szczególnie z rodziny n-3 w mięsie i jajach. Modyfikowanie profilu kwasów tłuszczowych produktów odzwierzęcych w PUFA odbywa się głównie poprzez stosowanie w żywieniu zwierząt siemienia lnianego, oleju lnianego lub olejów pochodzących z produktów morskich i oceanicznych (Moghadasian, 2008; Palmquist, 2009; Yeung i in., 2019). Źródłem kwasów tłuszczowych, ważnych z punktu widzenia diety człowieka mogą być nasiona konopi i ich produkty, w tym olej konopny, który zawiera kannabidiol. Mięsień piersiowy jest uważany za jedno z głównych źródeł PUFA

w diecie człowieka, a profil kwasów tłuszczowych mięsa może być modyfikowany poprzez paszę i stopień wchłaniania tłuszczu (Hulan i in., 1989; Poorghasemi in., 2013). W badaniu własnym dodatek ekstraktu z konopi siewnej (30 g/1000 g) do paszy dla kurcząt istotnie ($p \leq 0,05$) zmienił stosunek kwasów tłuszczowych n-6 do n-3. W grupie (CH2+CBD) po wywołaniu stanu zapalnego przez podanie *per os* LPS, stwierdzono obniżenie ($p \leq 0,05$) stosunku kwasów tłuszczowych n-6/n-3. Zastosowanie LPS i ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu do paszy miało istotny wpływ ($p \leq 0,05$) na zwiększenie koncentracji kwasów tłuszczowych PUFA n-3 w mięśniach piersiowych, co jest pozytywne z punktu widzenia diety człowieka. Samo podawanie ekstraktu z konopi siewnej (efekt główny CBD) nie wpłynęło ($p > 0,05$) negatywnie na poziom PUFA, kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 w mięśniach piersiowych. Olej konopny zawiera znaczne ilości kwasu linolowego (LA, 18:2, n-6), który stanowi ponad połowę całkowitego tłuszczu. Ponadto w składzie znajduje się około 16% kwasu α -linolenowego (ALA, 18:3, n-3), około 12% kwasu oleinowego (OA, 18:1, n-9), około 6% kwasu palmitynowego (PA, 16:0) i około 3% kwasu γ -linolenowego (GLA, 18:3, n-6), wśród kilku innych kwasów tłuszczowych (Callaway, 2004; House i in., 2010; Vonapartis i in., 2015; Kanbur, 2022). Zmiana profilu kwasów tłuszczowych w mięśniu piersiowym w kierunku zwiększenia koncentracji kwasów tłuszczowych n-6, a tym samym stosunku n-6/n-3 wydaje się uzasadniona.

Analizując zawartość kluczowych kwasów tłuszczowych (LA, ALA, DHA i PUFA), w badaniach własnych, stwierdzono, że włączenie 30 g/1000 g ekstraktu z konopi siewnej do paszy (efekt główny CBD) istotnie ($p \leq 0,05$) obniżyło koncentrację kwasów C18:2, C20:4, n-3 i n-6 w wątrobie. Obecność kwasu C18:3 n-3 stwierdzono ($p \leq 0,05$) jedynie w warunkach indukowanego stanu zapalnego. W grupie CON+CBD dodanie ekstraktu z konopi siewnej do paszy nie miało wpływu ($p > 0,05$) na poziom tego kwasu w tkance wątroby. Koncentracja tego kwasu tłuszczowego była poniżej progu wykrywalności ($< 0,050$ g/100 g). $\Delta 6$ -desaturaza ułatwia tworzenie GLA (kwas γ -linolenowy), który jest pierwszym produktem w konwersji kwasu linolowego do kwasu dihomu- γ -linolenowego (DGLA) i kwasu arachidonowego (AA). $\Delta 6$ -desaturaza, enzym występujący u człowieka i ptaków w niewielkich ilościach (Lands i in., 1990) ulega największej ekspresji w wątrobie, mózgu (szczególnie w neuronach i astrocytach), komórkach mięśniowych płuc, kardiomiocytach i komórkach siatkówki u człowieka. Stany zapalne w organizmie mogą również modyfikować aktywność $\Delta 6$ -desaturazy.

Infekcje mogą wyjaśnić obecność tych kwasów tłuszczowych w wątrobach kogutków narażonych na indukowany stan zapalny w badaniu własnym, w ilościach przekraczających próg wykrywalności (Fan i Chapkin, 1998).

Gdy kurczęta brojlery są zainfekowane, w ich organizmach mogą wystąpić różne zmiany biochemiczne, w tym zwiększona aktywność AST. AST znajduje się w komórkach wątroby, mięśniach, sercu i innych tkankach, a zwiększona aktywność może wynikać z uszkodzenia komórek lub stresu oksydacyjnego związanego z infekcją. Badanie Zhang i in. (2020) wykazało, że LPS wywołuje odpowiedź zapalną u kurcząt brojlerów. Aktywności AST i ALT w osoczu są powszechnie stosowane w warunkach klinicznych jako specyficzne markery uszkodzenia wątroby (Senior, 2012). Podawanie samego ekstraktu z konopi siewnej (30 g/1000 g) do paszy dla kogutków nie wpłynęło na zmiany poziomu AST w surowicy krwi. Gdy LPS jest podawany *per os* w celu wywołania stanu zapalnego, a ekstrakt z konopi siewnej jest stosowany do paszy, obserwowano wzrost aktywności AST. Przypisuje się to reakcji organizmu na lipopolisacharyd bakterii *E. coli*. Kinaza keratynowa (CK) to enzym obecny w mięśniach i innych tkankach, który ułatwia konwersję kreatyny i fosfokreatyny, które są niezbędne do magazynowania i transportu energii w komórkach mięśniowych. Podwyższona aktywność CK w surowicy krwi wskazuje na uszkodzenie mięśni, a na jej poziom wpływa szereg czynników, takich jak urazy, choroby lub stres. W badaniu własnym stwierdzono, że zastosowanie dodatku ekstraktu z konopi siewnej jako źródła kannabidiolu do paszy dla kurcząt prowadziło do obniżenia poziomu CK w surowicy i zapewniło ochronę przed *C. perfringens*, o czym świadczy obniżony poziom CK u kogutków z grupy CH1. W trakcie analizy rzeźnej nie obserwowano żadnych wad ani zmian w składzie chemicznym mięśni piersiowych, co może wskazywać na potencjalne działanie terapeutyczne ekstraktu z konopi siewnej w obniżaniu poziomu CK w surowicy.

W badaniach własnych nie stwierdzono, aby dodatek ekstraktu z konopi siewnej będący źródłem kannabidiolu do paszy, zwiększył ($p > 0,05$) aktywność antyoksydacyjną wystarczającą do zahamowania negatywnych skutków działania wolnych rodników. Niemniej warto zauważyć, że w przypadku grup CH1 i CH2, gdzie organizmy kurcząt były narażone na subkliniczne dawki *C. perfringens* i LPS, również nie stwierdzono istotnych różnic ($p > 0,05$), co pozwala stwierdzić, że dodatek ekstraktu z konopi siewnej

do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego wpłynął na utrzymanie potencjału antyoksydacyjnego na poziomie grupy CON. Mechanizmy stojące za tym zjawiskiem można przypisać lepszej zdolności usuwania reaktywnych form tlenu przez olej konopny zawierający PUFA, 9 γ -tokoferoli lub kannabidiol (Vispute i in., 2021).

Zastosowanie dodatku ekstraktu z konopi siewnej do paszy (30 g/1000 g) będącego źródłem kannabidiolu do paszy wpłynął istotnie ($p \leq 0,001$) na masę ciała kogutów w 35. dniu odchowu (efekt główny CBD). Badany ekstrakt poprawił istotnie ($p \leq 0,05$) masę ciała kogutów narażonych na działanie indukowanego stanu zapalnego wywołanego przez *C. perfringens* (CH1+CBD), podczas gdy efekt ten nie został stwierdzony w grupie CH2+CBD ($p > 0,05$). Zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej w żywieniu kurcząt nie wpłynęło negatywnie ($p > 0,05$) na parametry fizykochemiczne mięśnia piersiowego i podstawowy skład chemiczny mięśnia piersiowego i wątroby, zachowując ich charakterystyczne cechy. Zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej w żywieniu kurcząt zwiększa ($p \leq 0,05$) stosunek kwasów tłuszczowych n-6/n-3 w grupach CON i CH1. Zastosowanie dodatku 30 g/1000 g paszy ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu w żywieniu kurcząt pozwala na utrzymanie parametrów biochemicznych krwi i potencjału antyoksydacyjnego w warunkach indukowanego stanu zapalnego, co przyczynia się do utrzymania homeostazy organizmu kurcząt. Ekstrakt z konopi siewnej w ilości 30 g/1000 g paszy będący źródłem kannabidiolu może stanowić czynnik ochronny poprawiający wyniki odchowu w warunkach intensywnych systemów produkcji zwierzęcej.

5. Wnioski

5.1. Doświadczenie I: Określenie wpływu różnych form selenu (selenian sodu, drożdże selenowe i nano-Se) w ilości 0,5 mg/1000 g podanych do paszy na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

1. Brak negatywnego wpływu różnych form Se (selenian sodu, drożdże selenowe, nanocząstki Se) do paszy w ilości 0,5 mg/1000 g na wyniki odchowu kurcząt.
2. Zastosowanie dodatku drożdży selenowych i nano-Se do paszy (0,5 mg/1000 g) nie wpływa negatywnie na właściwości fizykochemiczne mięśnia piersiowego, potencjał antyoksydacyjny ani ultrastrukturę mięśnia piersiowego i wątroby kurcząt brojlerów. Poprawie uległy parametry jakościowe mięśnia piersiowego, takie jak długość sarkomerów.
3. Nanocząstki selenu w ilości 0,5 mg/1000 g paszy chronią mitochondria w hepatocytach i zwiększają właściwości antyoksydacyjne wątroby.
4. Dodatek selenianu sodu (0,3 mg/1000 g paszy) zwiększa koncentrację selenu w wątrobie kurcząt w porównaniu do selenianu sodu, drożdży selenowych i nano-Se w ilości 0,5 mg/1000 g paszy.
5. Drożdże selenowe (0,5 mg/1000 g paszy) zwiększają koncentrację Se w mięśniu piersiowym w porównaniu do selenianu sodu (0,3-0,5 mg/1000 g paszy) i nano-Se (0,5 mg/1000 g).
6. Nanocząstki selenu i drożdże selenowe (0,5 mg/1000 g paszy) zwiększają zawartość PUFA w mięśniu piersiowym i chronią lipidy przed reaktywnymi formami tlenu.

5.2. Doświadczenie II: Określenie wpływu ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g podanego do paszy w warunkach indukowanego stanu zapalnego poprzez podanie *per os* subklinicznych dawek *Clostridium perfringens* i liopolisacharydu z bakterii *E. coli* na wyniki odchowu i jakość mięsa kurcząt brojlerów.

1. Dodatek do paszy ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) będącego źródłem kannabidiolu w ilości 30 g/1000 g do paszy zwiększa masę ciała kogutków w 35. dniu odchowu.
2. Zastosowanie dodatku ekstraktu z konopi siewnej do paszy nie wpływa negatywnie na śmiertelność kurcząt i wskaźnik konwersji paszy.
3. Podanie ekstraktu z konopi siewnej (30 g/1000 g) do paszy nie wpływa negatywnie na parametry fizykochemiczne mięśnia piersiowego i podstawowy skład chemiczny mięśnia piersiowego i wątroby.
4. Zastosowanie dodatku 30 g/1000 g paszy ekstraktu z konopi siewnej będącego źródłem kannabidiolu w żywieniu kurcząt, pozwala na utrzymanie prawidłowych parametrów biochemicznych krwi i potencjału antyoksydacyjnego w warunkach indukowanego stanu zapalnego.

6. Zalecenia praktyczne

Uzyskane wyniki badań pozwoliły sformułować zalecenia dla producentów pasz i drobiu:

1. Zastosowanie w żywieniu kurcząt brojlerów dodatku selenu w formie nanocząstek w ilości 0,5 mg/1000 g do paszy jest odpowiedzią na coraz szybsze tempo wzrostu i metabolizm organizmu kurcząt, co może ograniczyć miopatie mięśnia piersiowego.
2. Mięso drobiowe o podwyższonej zawartości selenu może skutecznie ograniczyć niedobór selenu w diecie Polaków, stanowiąc element żywności funkcjonalnej.
3. Zastosowanie ekstraktu z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) w ilości 30 g/1000 g do paszy łagodzi negatywne skutki stanu zapalnego w organizmie i może zastępować podawanie leków, co przekłada się na poprawę stanu zdrowia ptaków bez negatywnego wpływu na jakość tuszek.

7. Bibliografia

- Ahmad, H., Tian, J., Wang, J., Khan, M. A., Wang, Y., Zhang, L., i Wang, T. (2012). Effects of dietary sodium selenite and selenium yeast on antioxidant enzyme activities and oxidative stability of chicken breast meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7111–7120. <https://doi.org/10.1021/jf3017207>
- Atalay, S., Jarocka-karpowicz, I., i Skrzydlewskas, E. (2020). Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*, T. 9, s. 21. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Aviagen. (2019). *Ross 308: Broiler Performance Objectives*. Aviagen Inc., Huntsville, AL. 1–15.
- Bai, K., Hong, B., Hong, Z., Sun, J., i Wang, C. (2017). Selenium nanoparticles-loaded chitosan/citrate complex and its protection against oxidative stress in d-galactose-induced aging mice. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0324-z>
- Barrett, A. J., i Heath, M. F. (1972). *Lysosomal enzymes*. In: *Lysosomes. A Laboratory Handbook*. J.T. Dingle, ed. Amsterdam: North-Holland Publ. Co.
- Batorska, M. (2013). *Wpływ wzbogacenia paszy dla rosnących świń w selen na wyniki produkcyjne i jakość wieprzowiny oraz koncentrację Se w wybranych tkankach i narządach*. Warszawa: Wydawnictwo SGGW.
- Bendowski, W., Michalczyk, M., Jóźwik, A., Kareem, K. Y., Łozicki, A., Karwacki, J., i Bień, D. (2022). Using Milk Thistle (*Silybum marianum*) Extract to Improve the Welfare, Growth Performance and Meat Quality of Broiler Chicken. *Animals*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091085>
- Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Debut, M., Santé-Lhoutellier, V., Baéza, E., Gigaud, V., ... Duclos, M. J. (2007). Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 85(8), 2005–2011. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-398>
- Betti, M., Schneider, B. L., Wismer, W. V., Carney, V. L., Zuidhof, M. J., i Renema, R. A. (2009). Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry Science*, 88(5), 1085–1095.

<https://doi.org/10.3382/ps.2008-00158>

- Bień, D., Michalczuk, M., Szkopek, D., Kinsner, M., i Konieczka, P. (2022). Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18101-2>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., i Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *T. 28*, ss. 25–30. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brynstad, S., i Granum, P. E. (2002). Clostridium perfringens and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(3), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00680-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00680-8)
- Cai, S. J., Wu, C. X., Gong, L. M., Song, T., Wu, H., i Zhang, L. Y. (2012). Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. *Poultry Science*, *91*(10), 2532–2539. Pobrano z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22991539/>
- Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(6). <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505s>
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, *140*(1–2), 65–72. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Castets, P., Bertrand, A. T., Beuvin, M., Ferry, A., Le Grand, F., Castets, M., ... Allamand, V. (2011). Satellite cell loss and impaired muscle regeneration in selenoprotein N deficiency. *Human Molecular Genetics*, *20*(4), 694–704. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq515>
- Chen, K., Fang, J., Peng, X., Cui, H., Chen, J., Wang, F., ... Zhou, Y. (2014). Effect of selenium supplementation on aflatoxin B1-induced histopathological lesions and apoptosis in bursa of Fabricius in broilers. *Food and Chemical Toxicology*, *74*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.09.003>
- Chen, Y., Zhang, H., Cheng, Y., Li, Y., Wen, C., i Zhou, Y. (2018). Dietary l-threonine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and

- intestinal barrier damage of broiler chickens at an early age. *British Journal of Nutrition*, 119(11), 1254–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114518000740>
- Cheng, H. W., Freire, R., i Pajor, E. A. (2004). Endotoxin stress responses in chickens from different genetic lines. 1. Sickness, behavioral, and physical responses. *Poultry Science*, 83(5), 707–715. <https://doi.org/10.1093/ps/83.5.707>
- Ciemińska-Zytkiewicz, H., Verardo, V., Pasini, F., Bryś, J., Koczoń, P., i Caboni, M. F. (2015). Determination of lipid and phenolic fraction in two hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chemistry*, 168, 615–622. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.07.107>
- Curtis, M. J., Jenkins, H. G., i Butler, E. J. (1980). The effect of *Escherichia coli* endotoxins and adrenocortical hormones on plasma enzyme activities in the domestic fowl. *Research in Veterinary Science*, 28(1), 44–50. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)32770-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)32770-x)
- de Boever, S., Croubels, S., Meyer, E., Sys, S., Beyaert, R., Ducatelle, R., i de Backer, P. (2009). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. *Avian Pathology*, 38(5), 403–411. <https://doi.org/10.1080/03079450903190871>
- Del Gobbo, L. C., Imamura, F., Aslibekyan, S., Marklund, M., Virtanen, J. K., Wennberg, M., ... Mozaffarian, D. (2016). ω -3 Polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: Pooling project of 19 cohort studies. *JAMA Internal Medicine*, 176(8), 1155–1166. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.2925>
- della Rocca, G., i Di Salvo, A. (2020). Hemp in Veterinary Medicine: From Feed to Drug. *Frontiers in Veterinary Science*, T. 7, s. 558206. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00387>
- Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych Zagraniczna Służba Rolna. (2024). *Livestock and Poultry: World Markets*. 1–19.
- Donovan, D. C., Schingoethe, D. J., Baer, R. J., Ryali, J., Hippen, A. R., i Franklin, S. T. (2000). Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2620–2628. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75155-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75155-1)

- Downs, K. M., Hess, J. B., i Bilgili, S. F. (2000). Selenium Source Effect on Broiler Carcass Characteristics, Meat Quality and Drip Loss. *Journal of Applied Animal Research*, 18(1), 61–72. <https://doi.org/10.1080/09712119.2000.9706324>
- Dudkiewicz, M., Szczepińska, T., Grynberg, M., i Pawłowski, K. (2012). A novel protein kinase-like domain in a selenoprotein, widespread in the tree of life. *PLoS ONE*, 7(2), 32138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032138>
- Dumont, E., Vanhaecke, F., i Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, T. 385, ss. 1304–1323. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>
- Dvorska, J. E., Pappas, A. C., Karadas, F., Speake, B. K., i Surai, P. F. (2007). Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 145(4), 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.005>
- Ertbjerg, P., i Puolanne, E. (2017). Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. *Meat Science*, T. 132, ss. 139–152. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.261>
- Fallahi, S., Bobak, Ł., i Opaliński, S. (2022). Hemp in Animal Diets—Cannabidiol. *Animals*, T. 12, s. 2541. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ani12192541>
- Fan, Y. Y., i Chapkin, R. S. (1998). Importance of dietary γ -linolenic acid in human health and nutrition. *Journal of Nutrition*, T. 128, ss. 1411–1414. J Nutr. <https://doi.org/10.1093/jn/128.9.1411>
- Folch, J., Lees, M., i Stanley, Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Gamble, L. J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., ... Wakshlag, J. J. (2018). Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Frontiers in veterinary science*, 5. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2018.00165>

- Gharib-Naseri, K., Kheravii, S. K., Keerqin, C., Morgan, N., Swick, R. A., Choct, M., i Wu, S. B. (2019). Two different *Clostridium perfringens* strains produce different levels of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(12), 6422–6432. <https://doi.org/10.3382/ps/pez480>
- Grau, R., i Hamm, R. (1953). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Muskel. *Die Naturwissenschaften*, 40(1), 29–30. <https://doi.org/10.1007/BF00595734>
- Grela, E. R., i Sembratowicz, I. (1997). Organiczne związki selenu w żywieniu zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna*, 53(7), 385–386.
- Grotenhermen, F., Russo, E., i Zuardi, A. W. (2017). Even High Doses of Oral Cannabidiol Do Not Cause THC-Like Effects in Humans: Comment on Merrick et al. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2016;1(1):102-112; DOI: 10.1089/can.2015.0004. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0036>
- Han, X. J., Qin, P., Li, W. X., Ma, Q. G., Ji, C., Zhang, J. Y., i Zhao, L. H. (2017). Effect of sodium selenite and selenium yeast on performance, egg quality, antioxidant capacity, and selenium deposition of laying hens. *Poultry Science*, 96(11), 3973–3980. <https://doi.org/10.3382/ps/pex216>
- Haug, A., Høstmark, A. T., i Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease* 2007 6:1, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 444:7121, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- House, J. D., Neufeld, J., i Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11801–11807. <https://doi.org/10.1021/jf102636b>
- Huang, J. C., Huang, M., Yang, J., Wang, P., Xu, X. L., i Zhou, G. H. (2014). The effects of electrical stunning methods on broiler meat quality: Effect on stress, glycolysis, water distribution, and myofibrillar ultrastructures. *Poultry Science*, 93(8), 2087–

2095. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03248>

- Huang, J. Q., Li, D. L., Zhao, H., Sun, L. H., Xia, X. J., Wang, K. N., ... Lei, X. G. (2011). The Selenium deficiency disease exudative diathesis in chicks is associated with downregulation of seven common selenoprotein genes in liver and muscle. *Journal of Nutrition*, *141*(9), 1605–1610. <https://doi.org/10.3945/jn.111.145722>
- Huang, L., Li, C., i Hwang, C. A. (2018). Growth/no growth boundary of *Clostridium perfringens* from spores in cooked meat: A logistic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, *266*, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.010>
- Hulan, H. W., Ackman, R. G., Ratnayake, W. M., i Proudfoot, F. G. (1989). Omega-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poultry science*, *68*(1), 153–162. <https://doi.org/10.3382/ps.0680153>
- Izzo, A. A., i Sharkey, K. A. (2010). Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacology and Therapeutics*, *126*(1), 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.12.005>
- Kanbur, G. (2022). Growth-depressing effect of dietary hempseed oil on broiler performance in the starting period and alterations in meat oxidation, serum parameters and abdominal fatty acids*. *Animal Science Papers and Reports*, *40*(2), 203–216.
- Kaniewski, R., Pniewska, I., Kubacki, A., Strzelczyk, M., Chudy, M., i Oleszak, G. (2017). Konopie siewne (*Cannabis sativa* L.) – wartościowa roślina użytkowa i lecznicza. *Postępy Fitoterapii*, *18*(2), 139–144. <https://doi.org/10.25121/pf.2017.16.2.139>
- Keerqin, C., Morgan, N. K., Wu, S. B., Swick, R. A., i Choct, M. (2017). Dietary inclusion of arabinoxylo-oligosaccharides in response to broilers challenged with subclinical necrotic enteritis. *British Poultry Science*, *58*(4), 418–424. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1327705>
- Keyburn, A. L., Bannam, T. L., Moore, R. J., i Rood, J. I. (2010). NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium Perfringens*. *Toxins*, *2*(7),

- 1913–1927. <https://doi.org/10.3390/toxins2071913>
- Kim, Y. Y., i Mahan, D. C. (2003). Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(3), 435–444. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.435>
- King, N. J., i Whyte, R. (2006). Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. *Journal of Food Science*, 71(4), R31–R40. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00029.x>
- Klein, T. W., i Cabral, G. A. (2006). Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, T. 1, ss. 50–64. <https://doi.org/10.1007/s11481-005-9007-x>
- Koj, A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, T. 1317, ss. 84–94. *Biochim Biophys Acta*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(96\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(96)00048-8)
- Kondaparthi, P., Flora, S., i Naqvi, S. (2019). Selenium nanoparticles: An insight on its Pro-oxidant and antioxidant properties. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology*, 6(1). <https://doi.org/10.15761/fnn.1000189>
- Konieczka, P., Barszcz, M., Chmielewska, N., Cieslak, M., Szlis, M., i Smulikowska, S. (2017). Metabolism and nutrition: Interactive effects of dietary lipids and Vitamin E level on performance, blood eicosanoids, and response to mitogen stimulation in broiler chickens of different ages. *Poultry Science*, 96(2), 359–369. <https://doi.org/10.3382/ps/pew219>
- Konieczka, P., Czauderna, M., Rozbicka-Wieczorek, A., i Smulikowska, S. (2015). The effect of dietary fat, Vitamin E and selenium concentrations on the fatty acid profile and oxidative stability of frozen stored broiler meat. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24(3), 244–251. <https://doi.org/10.22358/jafs/65630/2015>
- Konieczka, P., Barszcz, M., Kowalczyk, P., Szlis, M., i Jankowski, J. (2019). The potential of acetylsalicylic acid and vitamin e in modulating inflammatory cascades in chickens under lipopolysaccharide-induced inflammation. *Veterinary Research*, 50(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0685-4>
- Konieczka, P., Szkopek, D., Kinsner, M., Fotschki, B., Juśkiewicz, J., i Banach, J. (2020).

- Cannabis-derived cannabidiol and nanoselenium improve gut barrier function and affect bacterial enzyme activity in chickens subjected to *C. perfringens* challenge. *Veterinary Research*, 51(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00863-0>
- Konieczka, P., Szkopek, D., Kinsner, M., Kowalczyk, P., Michalczyk, M., Bień, D., ... Bogucka, J. (2022a). Cannabidiol and Nano-Selenium Increase Microvascularization and Reduce Degenerative Changes in Superficial Breast Muscle in *C. perfringens*-Infected Chickens. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 237, 24(1), 237. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010237>
- Konieczka, P., Szkopek, D., Kinsner, M., Kowalczyk, P., Michalczyk, M., Bień, D., ... Bogucka, J. (2022b). Cannabidiol and Nano-Selenium Increase Microvascularization and Reduce Degenerative Changes in Superficial Breast Muscle in *C. perfringens*-Infected Chickens. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 237, 24(1), 237. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010237>
- Konieczka, P., Wojtasik-Kalinowska, I., Poltorak, A., Kinsner, M., Szkopek, D., Fotschki, B., ... Michalczyk, M. (2022). Cannabidiol affects breast meat volatile compounds in chickens subjected to different infection models. *Scientific Reports*, 12(1), 18940–18940. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23591-1>
- Konkol, D., Korzeniowska, M., Róžański, H., Górnjak, W., Andrys, M., Opaliński, S., ... Korczyński, M. (2021). The use of selenium yeast and phytobiotic in improving the quality of broiler chicken meat. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112558>
- Krajowy Ośrodek Wsparcia Rolnictwa (2023). Sytuacja podaży-popytu i cenowa na rynku drobiu.
- Kralik, Z., Kralik, G., Grčević, M., Suchý, P., i Straková, E. (2012). Effects of increased content of organic selenium in feed on the selenium content and fatty acid profile in broiler breast muscle. *Acta Veterinaria Brno*, 81(1), 31–35. <https://doi.org/10.2754/avb201281010031>
- Lahti, P., Heikinheimo, A., Johansson, T., i Korkeala, H. (2008). Clostridium perfringens type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or

- IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 371–373. <https://doi.org/10.1128/JCM.01650-07>
- Lands, W. E. M., Morris, A., i Libelt, B. (1990). Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rat tissues. *Lipids*, 25(9), 505–516. <https://doi.org/10.1007/BF02537156>
- Langauer-Lewowicka, H., i Pawlas, K. (2016). Selen in the environment. *Environmental Medicine*, 19(1), 9–16.
- Legrand, P., i Hermier, D. (1992). Hepatic $\Delta 9$ desaturation and plasma VLDL level in genetically lean and fat chickens. *International Journal of Obesity*, 16(4), 289–294. Pobrano z <https://europepmc.org/article/med/1318283>
- Li, Y., Lang, P., i Linke, W. A. (2016). Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep24492>
- Lichtwark, G. A., Farris, D. J., Chen, X., Hodges, P. W., i Delp, S. L. (2018). Microendoscopy reveals positive correlation in multiscale length changes and variable sarcomere lengths across different regions of human muscle. *Journal of Applied Physiology*, 125(6), 1812–1820. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00480.2018>
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., i Korkeala, H. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology*, T. 28, ss. 192–198. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.020>
- Liu, B., Xiong, Y. L., Jiang, J., Yu, D., i Lin, G. (2021). Cellular antioxidant mechanism of selenium-enriched yeast diets in the protection of meat quality of heat-stressed hens. *Food Bioscience*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100798>
- Liu, H. J., Qin, Y., Zhao, Z. H., Zhang, Y., Yang, J. H., Zhai, D. H., ... Sun, T. (2020). Lentinan-functionalized selenium nanoparticles target tumor cell mitochondria via TLR4/TRAF3/MFN1 pathway. *Theranostics*, 10(20), 9083–9099. <https://doi.org/10.7150/thno.46467>
- Liu, L., Qin, D., Wang, X., Feng, Y., Yang, X., i Yao, J. (2015). Effect of immune stress

- on growth performance and energy metabolism in broiler chickens. *Food and Agricultural Immunology*, 26(2), 194–203. <https://doi.org/10.1080/09540105.2014.882884>
- Lyons, M. P., Papazyan, T. T., i Surai, P. F. (2007). Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(7), 1135–1155. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1135>
- Mahmoudi, M., Farhoomand, P., i Nourmohammadi, R. (2015). Effects of different levels of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) and dextran oligosaccharide on growth performance and antibody titer response of broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 14(1), 114–119. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3473>
- Mangan, B. N., Lashari, M. S., Hui, L., Ali, M., Baloch, A. W., i Song, W. (2016). Comparative analysis of the selenium concentration in grains of wheat and barley species. *Pakistan Journal of Botany*, 48(6), 2289–2296.
- Marković, R., Glišić, M., Bošković, M., i Baltić, M. (2017). New scientific challenges - The possibilities of using selenium in poultry nutrition and impact on meat quality. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85(1), 12032. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/012032>
- Marzella, L., i Glaumann, H. (1980). Increased degradation in rat liver induced by vinblastine. I. Biochemical characterization. *Laboratory Investigation*, 42(1), 8–17. Pobrano z <https://europepmc.org/article/med/7351833>
- Marzella, Louis, Ahlberg, J., i Glaumann, H. (1982). Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: Morphological and biochemical characterization. *Journal of Cell Biology*, 93(1), 44–154. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.1.144>
- Mateo, R. D., Spallholz, J. E., Elder, R., Yoon, I., 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(5), 1177–1183. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-067>
- Medina, D., Asch, B. B., i Oborn, C. J. (1983). Mitochondrial Inclusions in Selenium-Treated Mouse Mammary Epithelial Cell Lines. *Cancer Research*, 43(5), 2100–2105. Pobrano z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6187443/>

- Meyer, J. N., Leung, M. C. K., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E., i Bess, A. S. (2013). Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicological Sciences*, 134(1), 1–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft102>
- Michalczyk, M., Batorska, M., Sikorska, U., Bień, D., Urban, J., Capecka, K., i Konieczka, P. (2021). Selenium and the health status, production results, and product quality in poultry. *Animal Science Journal*, 92(1), e13662. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13662>
- Michalczyk, M., Jóźwik, A., Damaziak, K., Zdanowska-Sasiadek, Z., Marzec, A., Gozdowski, D., i Strzałkowska, N. (2016). Age-related changes in the growth performance, meat quality, and oxidative processes in breast muscles of three chicken genotypes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(4), 389–398. <https://doi.org/10.3906/vet-1502-64>
- Michalczyk, M., Zdanowska-Sasiadek, Ż., Damaziak, K., i Niemiec, J. (2017). Influence of indoor and outdoor systems on meat quality of slow-growing chickens. *CYTA - Journal of Food*, 15(1), 15–20. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1196246>
- Mireles, A. J., Kim, S. M., i Klasing, K. C. (2005). An acute inflammatory response alters bone homeostasis, body composition, and the humoral immune response of broiler chickens. *Poultry Science*, 84(4), 553–560. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.553>
- Moghadasian, M. H. (2008). Advances in dietary enrichment with N-3 fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 402–410. <https://doi.org/10.1080/10408390701424303>
- Morales-Lopez, R., i Brufau, J. (2013). Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *British Poultry Science*, 54(2), 247–251. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.782386>
- Neelakantan, H., Tallarida, R. J., Reichenbach, Z. W., Tuma, R. F., Ward, S. J., i Walker, E. A. (2015). Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. *Behavioural Pharmacology*, 26(3), 304–314. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000119>
- Oldfield, J. (2002). *Selenium world atlas*. Belgium: Grimbergen Selenium-Tellurium

Development Association (STDA).

- Oliveira, T. F. B., Rivera, D. F. R., Mesquita, F. R., Braga, H., Ramos, E. M., i Bertechini, A. G. (2014). Effect of different sources and levels of selenium on performance, meat quality, and tissue characteristics of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 1(23), 15–22. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00761>
- Olkowski, A. A., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., Laarveld, B., i Sawicki, G. (2008). Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: Novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.02.007>
- Olkowski, A., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., i Drew, M. D. (2006). Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science*, 81(1), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.10.006>
- Palmquist, D. L. (2009). Omega-3 Fatty Acids in Metabolism, Health, and Nutrition and for Modified Animal Product Foods. *Professional Animal Scientist*, 25(3), 207–249. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30713-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30713-0)
- Payne, R. L., i Southern, L. L. (2005). *Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers*. 84(6), 898–902. Pobrano z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15971527/>
- Placha, I., Borutova, R., Gresakova, L., Petrovic, V., Faix, S., i Leng, L. (2009). Effects of excessive selenium supplementation to diet contaminated with deoxynivalenol on blood phagocytic activity and antioxidative status of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(6), 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00857.x>
- Poorghasemi, M., Seidavi, A., Qotbi, A. A. A., Laudadio, V., i Tufarelli, V. (2013). Influence of dietary fat source on growth performance responses and carcass traits of broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(5), 705–710. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12633>
- Potapenko, E. V., Evdokimov, I. A., Oboturova, N. P., i Serov, A. V. (2015). Efficiency of adding essential micronutrients to the diet of broiler chickens. *Foods and Raw*

- Materials*, 3(2), 82–88. <https://doi.org/10.12737/13122>
- Poureslami, R., Turchini, G. M., Raes, K., Huyghebaert, G., i De Smet, S. (2010). Effect of diet, sex and age on fatty acid metabolism in broiler chickens: SFA and MUFA. *British Journal of Nutrition*, 104(2), 204–213. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000541>
- Praagman, J., Beulens, J. W. J., Alsema, M., Zock, P. L., Wanders, A. J., Sluijs, I., i Van Der Schouw, Y. T. (2016). The association between dietary saturated fatty acids and ischemic heart disease depends on the type and source of fatty acid in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Netherlands cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2), 356–365. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.122671>
- Puerto, M. del, Olivero, R., Terevinto, A., Saadoun, A., i Cabrera, M. C. (2016). Dietary Organic and Inorganic Selenium on Liver Glycogen and Lactate, pHu, Color and Drip Loss of Chicken *Pectoralis* and *Gastrocnemius* Muscles. *Open Journal of Animal Sciences*, 06(01), 59–67. <https://doi.org/10.4236/ojas.2016.61008>
- Raetz, C. R. H., i Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., i Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927–946. [Pobrano z /pmc/articles/PMC4258672/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258672/)
- Reh, W. A., Maga, E. A., Collette, N. M. B., Moyer, A., Conrad-Brink, J. S., Taylor, S. J., ... Murray, J. D. (2004). Hot topic: Using a stearyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3510–3514. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73486-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73486-4)
- Rehman, M., Fahad, S., Du, G., Cheng, X., Yang, Y., Tang, K., ... Deng, G. (2021). Evaluation of hemp (*Cannabis sativa* L.) as an industrial crop: a review. *Environmental science and pollution research international*, 28(38), 52832–52843. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-16264-5>

- Rosenkrantz, H., Fleischman, R. W., i Grant, R. J. (1981). Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 58(1), 118–131. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(81\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(81)90122-8)
- Salzet, M., i Stefano, G. B. (2002). The endocannabinoid system in invertebrates. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2–3), 353–361. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0347>
- Sarkar, J., Dey, P., Saha, S., i Acharya, K. (2011). Mycosynthesis of selenium nanoparticles. *Micro and Nano Letters*, 6(8), 599–602. <https://doi.org/10.1049/mnl.2011.0227>
- Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. (2014). *EFSA Journal*, 12(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>
- Senior, J. R. (2012). Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 92(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>
- Seremelis, I., Danezis, G. P., Pappas, A. C., Zoidis, E., i Fegeros, K. (2019). Avian stress-related transcriptome and selenotranscriptome: role during exposure to heavy metals and heat stress. *Antioxidants*, 8(7), 216. <https://doi.org/10.3390/antiox8070216>
- Sevcikova, S., Skřivan, M., Dlouhá, G., i Koucký, M. (2006). The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*, 51(10), 449–457. <https://doi.org/10.17221/3964-cjas>
- Shahidi, F. (1984). Flavour and Oxidative Rancidity in Meat Products. *36th International conference of meat science and technology*, 1008–1014.
- Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., i Liu, P. (2010). The effects of berberine on the magnitude of the acute inflammatory response induced by escherichia coli lipopolysaccharide in broiler chickens. *Poultry Science*, 89(1), 13–19. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00243>
- Skinner, J. T., Bauer, S., Young, V., Pauling, G., i Wilson, J. (2010). An economic analysis of the impact of subclinical (Mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 54(4), 1237–1240. <https://doi.org/10.1637/9399-052110-Reg.1>

- Skřivan, M., Marounek, M., Dlouhá, G., i Ševčíková, S. (2008). Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *British Poultry Science*, 49(4), 482–486. <https://doi.org/10.1080/00071660802236021>
- Ulbricht, T. L. V., i Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
- Valizadehderakhshan, M., Shahbazi, A., Kazem-Rostami, M., Todd, M. S., Bhowmik, A., i Wang, L. (2021). Extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L. (hemp)-review. *Agriculture (Switzerland)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/agriculture11050384>
- Visha, P., Nanjappan, K., Selvaraj, P., Jayachandran, S., i Thavasiappan, V. (2017). Influence of Dietary Nanoselenium Supplementation on the Meat Characteristics of Broiler Chickens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 340–347. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.039>
- Vispute, M. M., Sharma, D., Biswas, A. K., Rokade, J. J., Chaple, A. R., Biswas, A., ... Kapgate, M. G. (2021). Dietary Hemp (Cannabis sativa L.) and Dill Seed (Anethum graveolens) Improve Physicochemical Properties, Oxidative Stability, and Sensory Attributes of Broiler Meat. *ACS Food Science and Technology*, 1(3), 453–461. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00049>
- Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., i Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.004>
- Wadgaonkar, S. L., Nancharaiah, Y. V., Esposito, G., i Lens, P. N. L. (2018). Environmental impact and bioremediation of seleniferous soils and sediments. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 941–956. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1420623>
- Warren, H. S., Fitting, C., Hoff, E., Adib-Conquy, M., Beasley-Topliffe, L., Tesini, B., ... Cavillon, J. M. (2010). Resilience to bacterial infection: Difference between species could Be due to proteins in serum. *Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 223–232. <https://doi.org/10.1086/649557>

- Xie, H., Rath, N. C., Huff, G. R., Huff, W. E., i Balog, J. M. (2000). Effects of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Science*, 79(1), 33–40. <https://doi.org/10.1093/ps/79.1.33>
- Yang, X., Zhang, B., Guo, Y., Jiao, P., i Long, F. (2010). Effects of dietary lipids and Clostridium butyricum on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 89(2), 254–260. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00234>
- Yeung, A. W. K., Aggarwal, B. B., Barreca, D., Battino, M., Belwal, T., Horbańczuk, O. K., ... Atanasov, A. G. (2019). Dietary natural products and their potential to influence health and disease including animal model studies. *Animal Science Papers and Reports*, 36(4), 345–358. Pobrano z <https://pure.sruc.ac.uk/en/publications/dietary-natural-products-and-their-potential-to-influence-health->
- Yildiz, A., Kaya, Y., i Tanriverdi, O. (2019). Effect of the interaction between selenium and zinc on dna repair in association with cancer prevention. *Journal of Cancer Prevention*, 24(3), 146–154. <https://doi.org/10.15430/jcp.2019.24.3.146>
- Yu, L. L., Zhou, K. K., i Parry, J. (2005). Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry*, 91(4), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.044>
- Yuan, D., Zhan, X. A., i Wang, Y. X. (2012). Effect of selenium sources on the expression of cellular glutathione peroxidase and cytoplasmic thioredoxin reductase in the liver and kidney of broiler breeders and their offspring. *Poultry Science*, 91(4), 936–942. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01921>
- Zadrożniak, B., Radwańska, K., Baranowska, A., i Mystkowska, I. (2017). Possibility of Industrial Hemp Cultivation in Areas of High Nature Value. *Economic and Regional Studies / Studia Ekonomiczne i Regionalne*, 10(1), 114–127. <https://doi.org/10.2478/ers-2017-0009>
- Zahedi, A., On, V., Phandthong, R., Chaili, A., Remark, G., Bhanu, B., i Talbot, P. (2018). Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34455-y>
- Zhan, X. A., Wang, H. F., Yuan, D., Wang, Y., i Zhu, F. (2014). Comparison of different

- forms of dietary selenium supplementation on gene expression of cytoplasmic thioredoxin reductase, selenoprotein P, and selenoprotein W in broilers. *Czech Journal of Animal Science*, 59(12), 571–578. <https://doi.org/10.17221/7797-cjas>
- Zhang, H., Chen, Y., Chen, Y., Li, Y., Jia, P., Ji, S., ... Wang, T. (2020). Dietary pterostilbene supplementation attenuates intestinal damage and immunological stress of broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*, 98(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jas/skz373>
- Zhang, S., Xie, Y., Li, M., Yang, H., Li, S., Li, J., ... Jiang, S. (2020a). Effects of different selenium sources on meat quality and shelf life of fattening pigs. *Animals*, 10(4), 615. <https://doi.org/10.3390/ani10040615>
- Zhou, M., Zeng, D., Ni, X., Tu, T., Yin, Z., Pan, K., i Jing, B. (2016). Effects of bacillus licheniformis on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0219-2>
- Zhou, X., Jin, E., Li, S., Wang, C., Qiao, E., i Wu, G. (2015). Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(2), 203–210. <https://doi.org/10.3906/vet-1406-67>

Spis aktów prawnych:

1. Dyrektywa Komisji z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych (Dz.U. L 270 z 14.12.1970),
2. Ustawa z dnia 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt (Dz.U. 1997 nr 111 poz. 724),
3. Zalecenie 2007/526/WE w sprawie wytycznych dotyczących trzymania zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych i opieki nad tymi zwierzętami (Dz. U. UE L z dnia 30 lipca 2007 r.).

Spis norm:

1. PN-EN 13804: Artykuły żywnościowe - Oznaczanie pierwiastków śladowych i ich form chemicznych (data publikacji: 20-02-2015),
2. PN-EN 13805: Artykuły żywnościowe - Oznaczanie pierwiastków śladowych -- Mineralizacja ciśnieniowa (data publikacji: 28-11-2014),
3. PN-EN ISO: 5508: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce - Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej (data publikacji 16-12-1996),
4. PN-EN ISO: 5509: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce - Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych (data publikacji: 26-10-2001).

8. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. **2023**. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 905.

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. **2022**. Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11.

Bień Damian, Michalczuk Monika, Józwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. **2024**. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108.



Article

Nano-Sized Selenium Maintains Performance and Improves Health Status and Antioxidant Potential While Not Compromising Ultrastructure of Breast Muscle and Liver in Chickens

Damian Bień ^{1,*} , Monika Michalczyk ^{1,*} , Małgorzata Łysek-Gładysińska ^{2,3}, Artur Józwiak ³ , Anna Wieczorek ² , Arkadiusz Matuszewski ⁴ , Misza Kinsner ⁵ and Paweł Konieczka ^{5,6}

¹ Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences WULS-SGGW, 02-786 Warszawa, Poland

² Division of Medical Biology, Institute of Biology, University of Jan Kochanowski, Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce, Poland

³ Institute of Genetics and Animal Breeding PAS, Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland

⁴ Department of Animal Environment Biology, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences WULS-SGGW, 02-786 Warszawa, Poland

⁵ Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Instytutcka 3, 05-110 Jabłonna, Poland

⁶ Department of Poultry Science and Apiculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland

* Correspondence: damian_bien@sggw.edu.pl (D.B.); monika_michalczyk@sggw.edu.pl (M.M.)



Citation: Bień, D.; Michalczyk, M.; Łysek-Gładysińska, M.; Józwiak, A.; Wieczorek, A.; Matuszewski, A.; Kinsner, M.; Konieczka, P. Nano-Sized Selenium Maintains Performance and Improves Health Status and Antioxidant Potential While Not Compromising Ultrastructure of Breast Muscle and Liver in Chickens. *Antioxidants* **2023**, *12*, 905. <https://doi.org/10.3390/antiox12040905>

Academic Editors: Luciana Rossi and Matteo Dell'Anno

Received: 6 March 2023

Revised: 22 March 2023

Accepted: 8 April 2023

Published: 10 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The poultry industry is looking for the most effective sources of selenium (Se) for commercial use. Over the past five years, nano-Se has attracted a great deal of attention in terms of its production, characterisation and possible application in poultry production. The objective of this study was to evaluate the effects of dietary levels of inorganic and organic Se, selenised yeast and nano forms of selenium on breast meat quality, liver and blood markers of antioxidants, the ultrastructure of tissue and the health status of chickens. A total of 300 one-day-old chicks Ross 308 were divided into 4 experimental groups, in 5 replications, with 15 birds per replication. Birds were fed the following treatments: a standard commercial diet containing inorganic Se in the form of inorganic Se at the level of 0.3 mg/kg diet and an experimental diet with an increased level of Se (0.5 mg/kg diet). The use of other forms of Se (nano-Se) versus sodium selenate significantly influences ($p \leq 0.05$) a higher collagen content and does not impair physico-chemical properties in the breast muscle or the growth performance of the chickens. In addition, the use of other forms of selenium at an increased dose versus sodium selenate affected ($p \leq 0.01$) the elongation of sarcomeres in the pectoral muscle while reducing ($p \leq 0.01$) mitochondrial damage in hepatocytes and improving ($p \leq 0.05$) oxidative indices. The use of nano-Se at a dose of 0.5 mg/kg feed has high bioavailability and low toxicity without negatively affecting the growth performance and while improving breast muscle quality parameters and the health status of the chickens.

Keywords: chickens; selenium; nanoparticles; quality of meat; liver; ultrastructure; antioxidant potential; health status

1. Introduction

Selenium is an essential mineral element with important biological functions for the whole body, through incorporation into at least 30 selenoproteins [1–4]. The effect of selenium on the health of birds depends on the form in which it is supplied to the diet. Therefore, the poultry industry is currently searching for the most effective sources of Se for commercial use [5]. In animal nutrition, Se is most commonly used in two forms: inorganic, as sodium selenite (Na_2SeO_3) or sodium selenate (Na_2SeO_4), and organic, as selenomethionine (SeMet) or selenocysteine (SeCys) [6–9]. Se is an essential bio-element

that, together with other micronutrients such as zinc and iodine, plays a key role in the proper functioning, development and growth of various organisms [10]. The effect of selenium on the health of birds depends on the form in which it is supplied to the diet. Inorganic Se is passively absorbed from the intestine through a simple diffusion process and competes with many mineral elements for absorption pathways, and organic Se is actively absorbed through amino acid transport mechanism and has a higher bioavailability than the inorganic form [11]. The combination of SeMet + sodium selenite is more efficient than their individual treatments for Se deposition in egg and chicken embryo tissues. Although many studies have shown that organic Se is easier to absorb than inorganic Se, the reduction of competitive absorption leads to higher absorption efficiency and production performance of the combination of the two Se sources [12]. A thorough understanding of this mechanism requires further research and analysis. Se alleviates oxidative stress and peroxidative damage to unsaturated fatty acids and influences the efficiency of fatty acid biosynthesis in animal tissues [13,14]. Dietary selenium deficiency can adversely affect the fatty acid profile and the conversion of linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), resulting in an unfavourable $n - 6/n - 3$ ratio in tissue lipids [15–19]. Se supplementation has been found to stimulate the immune response, improve growth and reproductive performance and increase disease resistance. Se deficiency, on the other hand, increases the risk of myopathy, muscular dystrophy, causes immune declines and reduces poultry performance [20,21]. European Union regulations (list of authorised feed additives published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs (2004/C 50/01)) specify that the maximum level of Se in chicken feed must not exceed 0.5 mg/kg to ensure safe use of the feed. The requirement for Se ranges from 0.1 to 0.15 mg/kg in various poultry diets. In contrast, other authors [22,23] recommend increasing this dose to 0.3–0.75 mg/kg feed.

One of the most rapidly developing fields of science today is nanobiotechnology. The last 10 years have seen a breakthrough in research into the use of nanoparticles in poultry husbandry. Current research is mainly focused on the use of elements in nanometric form as replacements for their traditional sources [24]. Over the past five years, nano-Se has attracted a great deal of attention in terms of its production, characterisation and possible application in poultry production and other livestock species and medical science [25–31]. Nano-Se supplementation has variable effects compared to classical Se sources on the production performance of chickens, probably due to the variable amount of Se in the feed. However, nano-Se has significant effects on Se retention in tissues, GPx activity, or modification of the fatty acid profile in poultry, with less toxic effects. The authors of this study [32] found that the addition of nano-Se at doses up to 30 mg/kg had a significant effect on ma-weight gain and lower FCR. Comparing nanoparticles with Na_2SeO_3 in broiler chickens, it was found that the addition of nanoparticles in amounts of 0.2 and 0.5 mg/kg and the addition of sodium selenite (0.2 mg/kg) relative to the control group improved body weight gain and FCR, but the form of Se used had no significant effect on improving the aforementioned parameters. In a similar study, where the same Se sources were compared at four doses (0.15, 0.30, 0.60 and 1.2 mg/kg) in broiler chickens, Hu et al. [33] found that chickens had better weight gain using a dose of up to 30 mg/kg, which, however, deteriorated in later stages of rearing. With nano-Se, average daily gains and FCR improved already at a dose of 0.15 mg/kg with no change over time as with the application of Na_2SeO_4 . The application of nano-Se at 0.5 mg/kg of feed to broiler chickens has a significant effect on the higher PUFA (polyunsaturated fatty acid) content and the protection of lipids against the action of reactive oxygen species, with its high bioavailability and low toxicity for the chicken organism. The use of higher doses of Se in feed (than the recommended 0.3 mg/kg) is a response to the increasingly rapid growth rate of the chicken body. This will provide consumers with a high-quality product rich in good-quality fats [34]. Nano-Se at a dose higher than 2 mg/kg appears to be toxic to the organisms of birds, as when studying the effects of nano-Se at a dose of 0.30 mg/kg versus 2 mg/kg, deterioration of glutathione peroxidase (GPx) activity, concentration of

immunoglobulin M (the main antibodies produced during first contact of the organism with an antigen), glutathione, malondialdehyde and thus deterioration of the free radical scavenging capacity in the serum, liver, and muscle of birds was found for a dose of 2 mg/kg. Studies conducted to date [22,33] suggest that nano-Se has a higher absorption rate and antioxidant capacity at a wide range between nutritional and toxic dose compared to sodium selenite. This allows for the conclusion that the toxicity of nano-Se is even lower than even selenomethionine.

Given the steadily increasing growth performance of broiler chickens, it seems appropriate to determine the effect of increased dietary supplementation with Se, especially Se in the form of nanoparticles. However, there is an urgent need to address issues related to the absorption, assimilation and metabolism of nano-Se in animals/poultry before it can find its way into animal/poultry production as a feed supplement [35]. The aim of this study was to compare the effects of different forms of Se, including nano-Se, on the health status, antioxidant potential and ultrastructural changes of breast muscle and liver in chickens.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Diets

The experiment was carried out with 300 Ross 308 chicken broilers randomly allocated to 4 experimental groups, in 5 replications, 15 birds per replication. Chickens were reared under standard conditions for 6 weeks (from hatching day until 42 days of life). They had free access to water and were kept under a controlled light cycle (according to the Aviagen Ross 308: Broiler Performance Objectives. Aviagen Inc., Huntsville, AL, USA, 2019, 1–15). For the first 10 days, all birds were fed the same starter diet balanced to meet their nutritional demands. On day 11 of life, birds started to receive respective diets. Chicken diets are presented in our previous manuscript [34]. Experimental groups differed in terms of Se form implemented in the diet, for example:

CON (control group)—diet meeting nutritional demands of Ross 308 broilers with the basic (recommended) dose of inorganic Se (SS, 0.3 mg/kg feed),

T1 (SS)—diet with upper dose of inorganic Se (sodium selenate, 0.5 mg/kg feed),

T2 (SY)—diet with upper dose of Se in the organic form (selenised yeast, commercial preparation) (0.5 mg/kg feed),

T3 (nano-Se)—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (commercial preparation) (0.5 mg/kg feed).

2.2. Selenium Forms Used in the Diets

In the CON treatment, a sodium selenate form was used, which was provided in the diet with a vitamin–mineral premix. This form of Se is commonly used in the formulation of diets for broiler chicken [36]. In the treatment of T2, a premix-provided Se was substituted by the Se-enriched yeast provided in the form of commercial product (SelPlex 1000, Alltech, Nicholasville, KY, USA) according to manufacturer declaration. In the treatment T3, Se was provided with the premix in the form of nanoparticles. Briefly, nano-Se in the form of nano-powder was obtained by chemical synthesis. According to manufacturer declaration (American Elements, Los Angeles, CA, USA), average particle size was 10–45 nm, specific surface area was approximately 30–50 m²/g, and purity was 99.9%.

2.3. Sampling Procedures

Forty cockerels were chosen (10 birds from each treatment; 2 birds for each replicate) for slaughter at the age of 42 days of life that had a body weight similar to the group mean. The pectoral muscle, liver, and blood samples were taken for analysis: chemical composition, physico-chemical properties, selenium content determination, indicators of health status and antioxidant potential and analysis of ultrastructure.

2.4. Assessment of Slaughter Efficiency, Chemical Composition, and Physico-Chemical Properties

Upon completion of the feeding experiment, 10 cockerels ($n = 10$) per experimental group were randomly selected and weighed before slaughter. After slaughter and cooling of the carcasses, the slaughter efficiency of the chickens was assessed based on a previous report by Michalczuk et al. [37], determining the percentages of the pectoral muscle, legs, and giblets. The basic chemical composition was determined for the collected samples of pectoral muscles: dry weight, crude fat, crude protein, and ash. The determinations were made using the NIR method [37]. The pH value, drip loss, WHC and colour parameter (L^* , a^* , b^*) were analysed according to the method by Michalczuk et al. [38] and ΔE parameter by the method described by Bendowski et al. [39].

2.5. Selenium Content Determination

Determination of Se content in breast muscle and liver ($n = 10$) was performed according to the PB-28/LF method in an accredited laboratory (PCA Accreditation Certificate No. AB 1095, Issue No. 19, dated 1 January 2022). A full description of the method can be found in our previous manuscript [34].

2.6. Indicators of Health Status and Antioxidant Potential

On the day of slaughter, ten birds ($n = 10$) per experimental group were randomly chosen to collect blood post-mortem in the amount of 1.5 mL per bird. Laboratory analysis aimed to also determine the activity of selected enzymes and antioxidant compounds by analysing blood samples and 5 g fragments of breast muscle and liver tissue.

In order to determine the effect of the different sources and levels of Se on the health of the chickens, the activity of the following hydrolytic enzymes from the blood, liver and pectoral muscles of the chickens was determined: alanine aminopeptidase (AlaAP, EC 3.4.11.2), leucine aminopeptidase (LeuAP, EC 3.4.11.1), and arginine aminopeptidase (ArgAP, EC 3.4.11.6), which are all responsible for limiting harmful metabolism and accelerating protein circulation in the body, which translates into better weight gain. The following compounds were also determined: the activity of acid phosphatase (AcP, EC 3.1.3.2), beta-glucuronidase (BGRD, EC 3.2.1.31), beta-galactosidase (BGAL, EC 3.2.1.23), beta-glucosidase (BGLU, EC 3.2.1.21), alpha-glucosidase (aGlu, EC 3.2.1.20), mannosidase (MAN, EC 3.2.1.25), and N-acetyl-BD-hexosaminidase (HEX, EC 3.2.1.52). These compounds are responsible for breaking down complex sugars into simple sugars and for the removal of harmful metabolites formed inside the cell [39].

The activity of aminopeptidases was measured as Fast Blue BB salt derivatives at 540 nm by the method of [40], whereas the activity of AcP, BGRD, BGAL, BGLU, aGLU, aMAN, and HEX was measured as 4-nitrophenyl derivatives at 420 nm according to [41]. All determinations were performed with use of Varian Cary 50 Bio UV-VIS spectrophotometer (Santa Clara, CA, USA). The enzyme activity was expressed in nmol/mg protein/h.

The effect of Se type and dose on the oxidative status in analysed tissues of broiler chickens was tested using the following determinations: vitamin C, glutathione (GSH), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The concentration of vitamin C in the collected tissues was determined using a LambdaBio-20 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), whereas the level of GSH was determined by means of the OxisResearch™ Bioxytech® GSH/GSSG—412™ test (Foster City, CA, USA) according to the methods described by [42]. Measuring the radical scavenging activity was carried out using a routine test procedure employing the synthetic radical DPPH [42,43].

2.7. Analysis of Ultrastructure

Immediately after chicken slaughter, small fragments of the pectoral muscle and liver were taken and cut into properly sized pieces (2 mm^3) and fixed by immersion in buffered 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.2) for at least 2 h at 4°C . The tissue specimens were then post-fixed in 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h at 4°C . Dehydration of the fixed tissues was performed using an ascending series of ethanol and

then transferred into epoxy resin via propylene oxide [44]. Finally, the liver samples were embedded in a mixture of DDSA/NMA/EMbed-812 (Agar Scientific Ltd., London, UK). Ultra-thin sections (40–60 nm) were cut on a Reichert–Jung ultramicrotome and double stained with uranyl acetate and lead citrate. Evaluation of ultrastructure was performed using a transmission electron microscope TESLA BS-500 with Frame Transfer-1K-CCD-Camera (TRS, Mannheim, Germany).

2.8. Statistical Evaluation

Mean values in the analysed samples were processed using the PS IMAGO PRO 8.0 statistical package employing one-way analysis of variance (ANOVA). The normality of the data was checked with the Shapiro–Wilk test. The homogeneity of variance was also checked with the help of Levene’s test for homogeneity of variance. Tukey’s test was used to determine the significance of differences between the examined groups. The results were considered statistically significant when associated with a probability lower than 5%. The results with a probability lower than 1% were considered highly significant.

3. Results

The use of different forms of Se in the chickens’ diets at increased doses did not significantly ($p > 0.05$) affect the birds’ growth performance (Table 1). The results obtained are representative and do not differ from the expected performance for chicken [45].

Table 1. Chicken growing results.

Indices	Group				SEM	<i>p</i> Value
	CON	T1	T2	T3		
Body weight (BW), g:						
1 day	37.32	37.87	38.24	38.18	0.167	0.415
42 day	3012.22	2999.30	3037.50	2989.70	22.728	0.554
FCR, kg kg ⁻¹	1.63	1.55	1.57	1.53	0.023	0.130
Mortality, %	2.66	1.33	2.66	1.33	0.012	0.479

Data are given as mean \pm SEM (n = 10); CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

The form of Se at the increased dose had no significant effect on the results of the slaughter analysis of chickens (Table 2). Final weight and carcass weight, slaughter yield and proportion of individual internal organs relative to BW were not significantly different from the CON group ($p > 0.05$).

In the present study, neither the supplemental form of Se nor the different doses of Se were found to have a negative effect on selected parameters of the chemical composition of the pectoral muscles (BM) of cockerels ($p > 0.05$) (Table 3). Only the total collagen content of the BM differed significantly ($p \leq 0.01$). T2 pectoral muscles had the highest concentration of collagen in the muscle tissue, nearly 40% more collagen relative to CON. The addition of nano-Se did not significantly affect ($p > 0.05$) the collagen content of the BM with respect to the application of SS at 0.5 mg/kg feed.

The highest Se concentration (Figure 1A) in the pectoral muscles (CON = 0.27; T1 = 0.37; T2 = 0.42; T3 = 0.12 mg/kg) was determined in the chickens of the T2 group ($p \leq 0.01$). For the liver (Figure 1B), the highest Se concentration in these tissues was found ($p \leq 0.01$) in the CON group (CON = 3.79; T1 = 2.90; T2 = 0.86; T3 = 0.49 mg/kg).

The use of different forms of Se in the diet of chickens at a dose of 0.5 mg/kg feed had a significant effect ($p \leq 0.05$) on the physico-chemical properties of breast muscle (Table 4). The BM of cockerels fed with SS (0.5 mg/kg feed) had the lowest pH₂₄ (5.53) and the highest drip loss (3.01%) and WHC (3.11 cm²/g) relative to the analysed groups. Increasing the dose of Se in the form of other sources relative to CON significantly ($p \leq 0.05$) affected WHC and drip loss parameters. However, the use of a dose of 0.5 mg/kg SS in the chickens’ diet had a significant effect on the deterioration of parameters related to the suitability

of the meat for use in a specified product. The addition of SS at an increased dose had a significant effect ($p \leq 0.01$) on higher levels of L^* and b^* parameters relative to the other test groups. This was also confirmed by analysis of the ΔE parameter. The muscles from cockerels with the increased dose of SS supplementation in the diet had the highest and visually apparent colour deviation ($\Delta E = 4.53$) relative to the muscles from the CON.

Table 2. Results of male broiler chicken slaughter analysis.

Indices	Group				SEM	<i>p</i> Value
	CON	T1	T2	T3		
Body weight, g	3343.75	3235.44	3251.76	3236.00	19.964	0.166
Carcass weight, g	2525.60	2446.22	2438.46	2417.74	17.626	0.143
Dressing percentage, g per 100 g BW	75.56	75.60	75.00	74.71	3.293	0.738
Breast muscles, g per 100 g BW	28.19	28.42	28.00	28.20	1.484	0.811
Leg muscles, g per 100 g BW	19.38	19.77	18.94	19.78	3.212	0.785
Gizzard, g per 100 g BW	0.82	0.83	0.83	0.83	0.023	0.710
Heart, g per 100 g BW	0.75	0.79	0.80	0.80	0.014	0.620
Liver, g per 100 g BW	2.16	2.29	2.29	2.33	0.042	0.380
Abdominal fat, g per 100 g BW	1.48	1.49	1.51	1.54	0.023	0.810

Data are given as mean \pm SEM (n = 10); CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

Table 3. Selected chemical components of breast muscles of male broiler chickens.

Indices, %	Group				SEM	<i>p</i> Value
	CON	T1	T2	T3		
Moisture	75.32	76.41	75.46	74.86	0.254	0.065
Total fat	0.87	0.89	1.48	1.10	0.243	0.121
Total protein	23.53	23.32	22.85	23.35	0.194	0.383
Total ash	1.40	1.41	1.44	1.50	0.198	0.175
Total collagen	0.37 ^A	0.44 ^{AB}	0.93 ^C	0.75 ^{BC}	0.129	<0.001

Data are given as mean \pm SEM (n = 10); ^{A, B, C}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

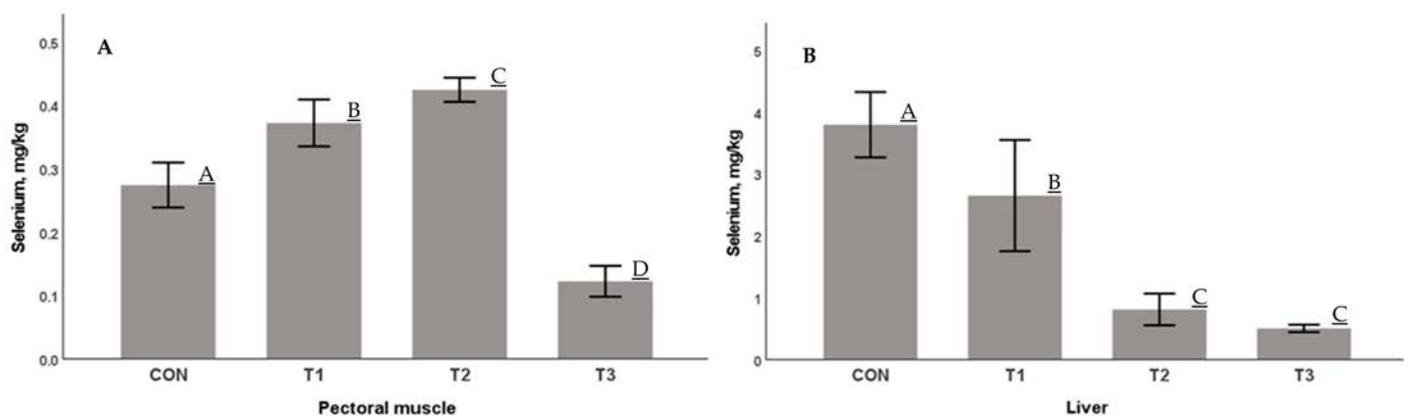


Figure 1. The effect of using increased doses of various forms of Se on Se content in tissues: (A) breast muscle; (B) liver. Data are given as mean \pm SEM (n = 10). ^{A, B, C, D}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

Table 4. Physico-chemical properties of breast muscles of male broiler chickens.

Indices	Group				EM	p Value
	CON	T1	T2	T3		
pH ₂₄	5.64 ^A	5.53 ^C	5.73 ^B	5.72 ^{AB}	0.017	<0.001
Drip loss, %	2.81 ^A	3.01 ^B	2.57 ^A	2.51 ^A	0.212	0.023
WHC, cm ² /g	2.34 ^A	3.11 ^B	2.70 ^A	2.54 ^A	0.123	0.016
L* lightness	63.70 ^A	67.46 ^B	61.61 ^A	60.71 ^A	0.572	<0.001
a* redness	12.50	12.71	12.73	12.53	0.161	0.943
b* yellowness	9.69 ^A	12.20 ^B	9.16 ^{AC}	8.11 ^C	0.294	<0.001
ΔE CON: T1–T3	0.00	4.53	2.17	3.38	-	-

Data are given as mean ± SEM (n = 10). ^{A, B, C}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; parameter L* (colour brightness) can have values from 0 to 100. Parameters a* (redness) and b*(yellowness) are tri-chromaticity coordinates and can have positive and negative values: +a* corresponds to red, +b* to yellow. ΔE—absolute colour difference; ^{A, B, C}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

Additionally, tissue sections of chicken livers and pectoral muscles from all four experimental groups were examined by transmission electron microscopy to determine the ultrastructural changes that correlate with the effects of the Se diet. The comparison of ultrastructural changes in pectoral muscle fibres is shown in Figure 2.

Ultrastructural analysis of the muscle fibres of broiler chickens fed a standard commercial diet containing inorganic Se at a level of 0.3 mg/kg BW of diet (CON) showed myofibrils with an irregular arrangement, becoming constricted and disrupted in places. Myofibrils are separated by sarcoplasm with visible mitochondria with slightly damaged structure. Sarcomeres showed regular organization of actin and myosin fibrils (Figure 2A,B). More ultrastructural changes in muscle fibres were found after supplementation with inorganic Se at a dose of 0.5 mg/kg BW. Irregularly arranged, markedly constricted myofibrils with a loose structure, patchy in places, separated by puffy sarcoplasm were seen. Also shown are swollen mitochondria with damaged cristae. Of note are sarcomeres with a significantly narrowed profile and damaged structure (Figure 2C,D). Figure 2E,F shows the ultrastructure of myofibrils of broiler chickens remaining dieting with an upper dose of Se in the organic form at a dose of 0.5 mg/kg feed. Normal parallel-running myofibrils with a compact regular structure are visible. The sarcomere structure with regular organization of actin and myosin filaments is well preserved. Mitochondria have the correct structure. The ultrastructure of the pectoral muscle of broiler chickens from the T3 group shows normal, parallel-running myofibrils with a compact, regular structure. Sarcomeres showed a regular organization of actin and myosin filaments. A proper mitochondrial profile with a slightly translucent mitochondrial matrix is shown (Figure 2G,H).

The ultrastructural analysis also showed statistically significant differences in sarcomere lengths ($p \leq 0.01$). The shortest sarcomeres were found after supplementation with inorganic Se at a dose of 0.5 mg/kg BW, which was 1.64 μm compared to the control. The length of sarcomeres increased significantly in both groups of birds (T2 and T3) remaining on diets containing organic Se and nano-Se (Figure 3). In birds fed from the T2 group, the length of sarcomeres was 1.79 μm, and in birds from the T3 group, it was 1.81 μm.

The hepatocytes of broilers fed the diet containing inorganic Se at the level of 0.3 mg/kg feed (CON) show almost normal morphology (Figure 4A,B). Inside hepatocytes, a centrally located single nucleus of varying shape, usually spherical or oval, is visible. It is characterized by a conventional pattern of nuclear architecture: euchromatin is located mostly in the nuclear centre, whereas heterochromatin tends to be found in perinuclear and perinuclear positions (the rim of heterochromatin typically lines the nuclear periphery) as well as forming random clumps throughout the nucleoplasm. The double membrane of the nuclear envelope (including perinuclear space and nuclear pores), is well visualized, and it is not affected (Figure 4A,B).

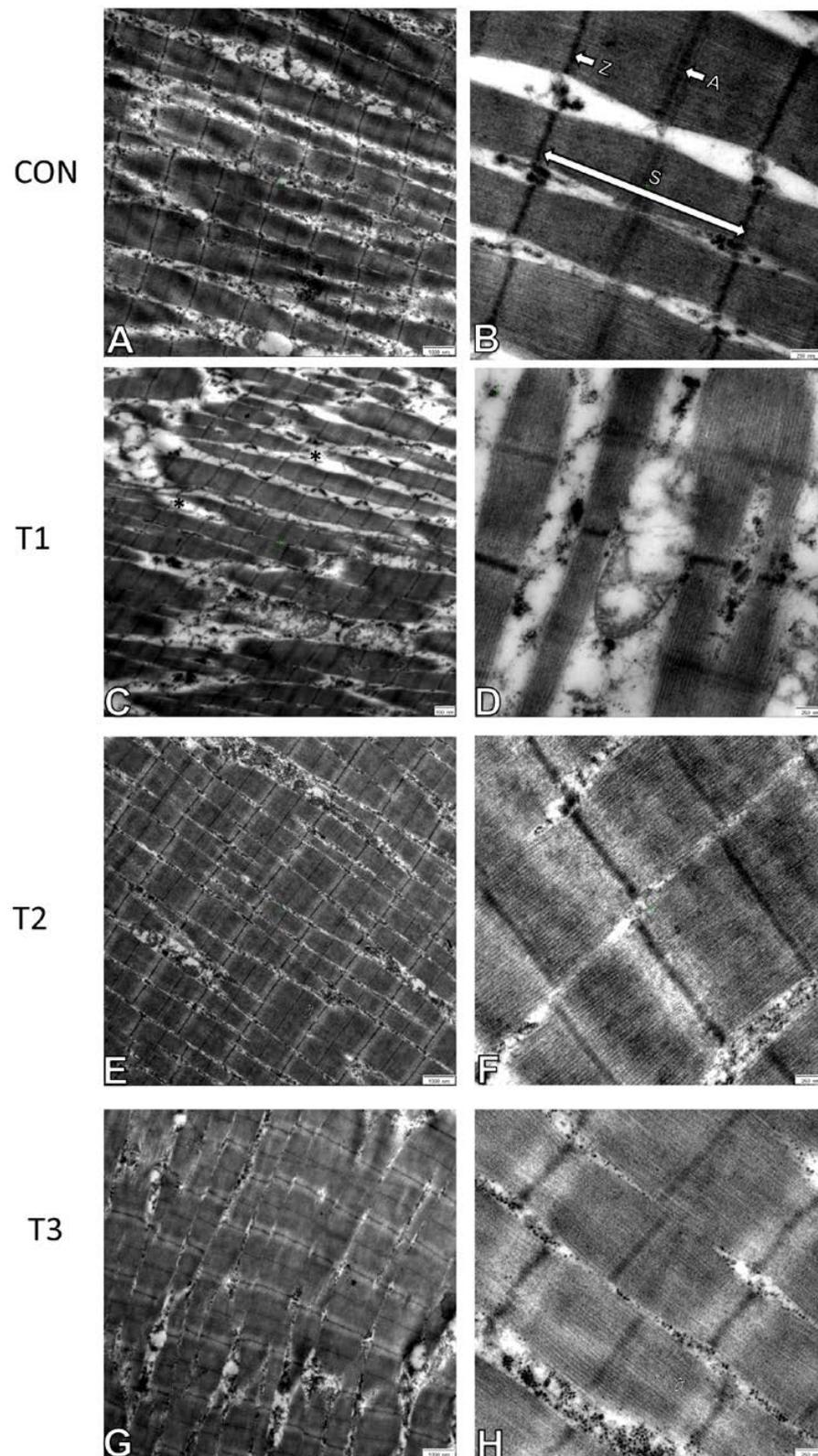


Figure 2. Ultrastructure of representative myofibers of the pectoral muscle of cockerels: CON—control group (A,B), T1—diet with upper dose of inorganic Se (C,D), T2—diet with upper dose of Se in the organic form (E,F), T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (G,H). Scale bar 1000 nm (A,C,E,G) and 250 nm (B,D,F,H). S—sarcomere; A—A band; Z—Z band; *—indicates the disruption of myofibers.

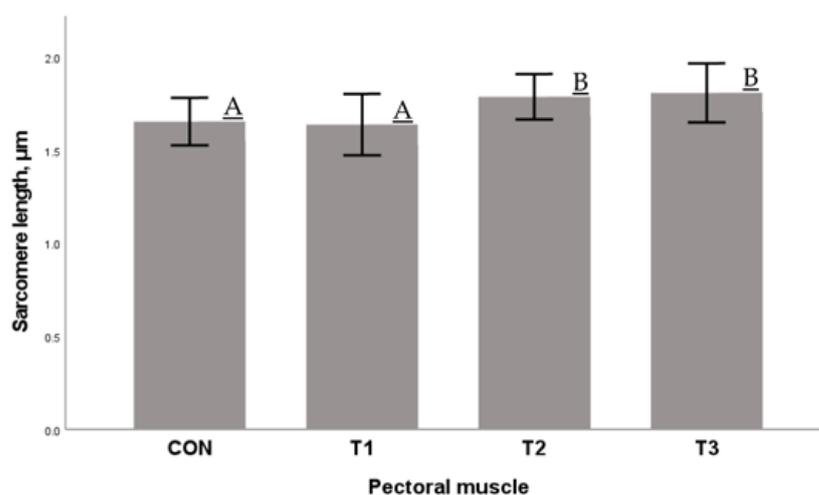


Figure 3. Length of sarcomeres in the pectoral muscle of cockerels. Data are given as mean \pm SEM ($n = 10$); ^{A, B}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

The cytoplasm is rich in normal, double-membraned mitochondria, whose inner membrane periodically invaginates into lamellar cristae and surrounds a mitochondrial matrix of normal density (Figure 4B). The vast majority of mitochondria appear normal or show only little changes. In a few mitochondria, the presence of spherical electron-dense inclusions in the mitochondrial matrix is noteworthy (Figure 4A). A moderate amount of rough endoplasmic reticulum of normal organization forms a membrane network that surrounds mitochondria and extends across the entire cytoplasm. Ribosomes are bound to the cytoplasmic surfaces of cisternae in a more or less regular pattern. The characteristic lamellar membranous structure of the Golgi apparatus (ribbon-like shape) and its typical location near the nucleus can be seen. In addition, few primary lysosomes are visible near the nucleus (Figure 4A). Figure 4C,D presents the hepatocytes of the chicken fed the diet in the T1 group. Their morphology differs significantly from that described above. Although the cell nuclei have the correct structure, cytoplasmic organelles, especially mitochondria, are significantly altered. As shown in Figure 4C, almost all mitochondria exhibit varying degrees of hydropic degeneration; they have a vacuolated matrix and damaged inner membrane, including a high degree of cristae disorganization. In addition, the mitochondrial matrix of numerous mitochondria contains clusters of osmiophilic spherical deposits/inclusions (Figure 4D). Damaged mitochondria ($p \leq 0.01$) represent 91.83% of the total amount in the cell (Figure 5).

There is a noticeable reduction in the number of cisternae of the rough endoplasmic reticulum while maintaining its unique structure. The appearance of autophagic vacuoles (Figure 4C) and the reduction of primary lysosome numbers are noteworthy.

The ultrastructure of hepatocytes of the chicken fed the diet with an upper dose of Se in the organic form (SY) at the level of 0.5 mg/kg feed (T2) appears normal (Figure 4E,F) and is similar to that observed in chickens fed the recommended diet. Mitochondria show no significant abnormalities in their morphology. However, some mitochondria are swollen and have damaged cristae. They account for 25.43% of the total amount in the cell (Figure 5). This is noteworthy that they do not contain any electron-dense material in the matrix. Instead, numerous primary lysosomes appeared (Figure 4F). They are distributed randomly within the cytoplasm. A nearly identical picture of hepatocytes was also observed in the chicken in group T3 (Figure 4G,H). Swollen mitochondria with damaged cristae also occur. They account for 26.96% of the total amount in the cell (Figure 5).

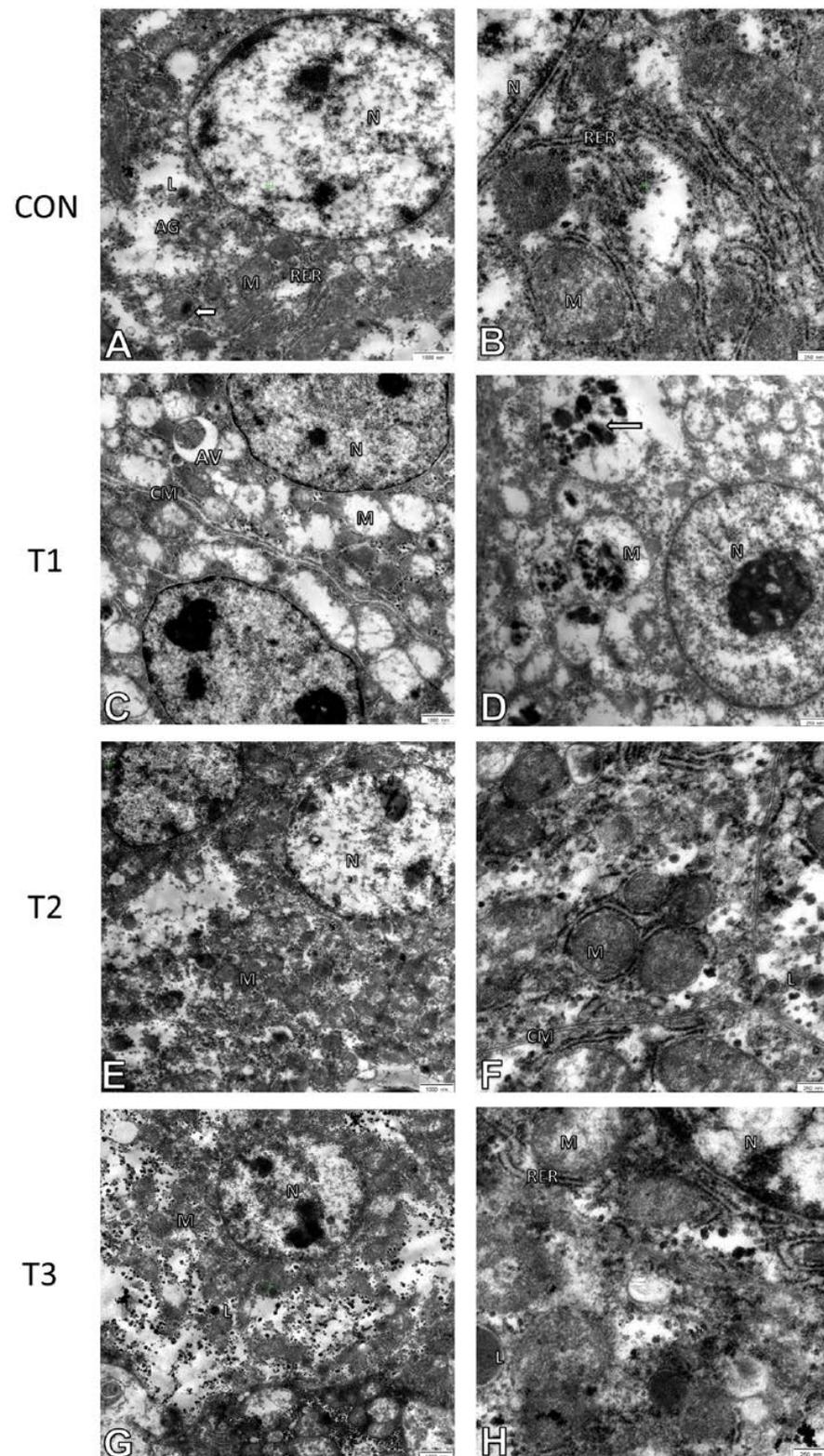


Figure 4. Ultrastructure of representative hepatocytes of cockerels: CON—control group (A,B), T1—diet with upper dose of inorganic Se (C,D), T2—diet with upper dose of Se in the organic form (E,F), T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (G,H). Scale bar 1000 nm (A,C,E,G) and 250 nm (B,D,F,H). N—nucleus; M—mitochondria; RER—rough endoplasmic reticulum; L—lysosomes; AV—autophagic vacuole; CM—cell membrane; arrow—electron dense deposits in mitochondria.

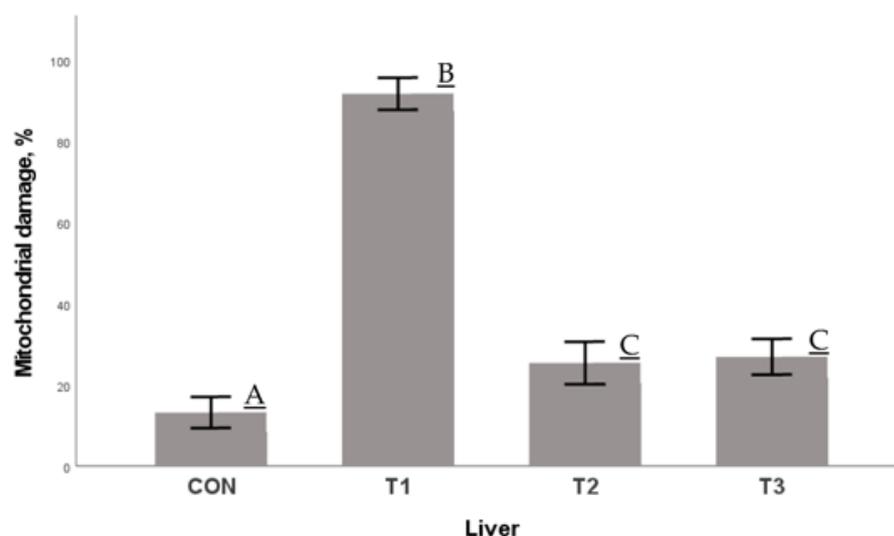


Figure 5. Mitochondrial damage in the liver. Data are given as mean \pm SEM ($n = 10$); A, B, C—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

The use of inorganic Se (CON and T1) in the chickens' diet significantly ($p \leq 0.01$) decreased AcP in pectoral muscle tissue. At the same time, HEX activity increased significantly ($p \leq 0.05$) using SS in the chickens' diet at an increased dose. The activity of aminopeptidases including AlaAP, LeuAP, ArgAP decreased in the breast muscle ($p \leq 0.01$) when inorganic sources of Se were used (Table 5). The addition of other Se sources in the chickens' diet other than SS influenced ($p \leq 0.05$) the reduction of BGAL, BGLU and MAN activities. Nano-Se significantly ($p \leq 0.01$) influenced the increase in aminopeptidase activity. In addition, AcP, HEX and aGlu activities increased significantly ($p \leq 0.05$).

Exposure of chicken to a diet with the upper dose of inorganic Se (T1) significantly ($p \leq 0.01$) reduced the activity of AcP and HEX in the liver compared to the control group (CON). In contrast, BGRD and BGAL activities increased ($p \leq 0.01$). As for aminopeptidase activity, LeuAP activity increased significantly, while AlaAP and ArgAP activity decreased ($p \leq 0.05$). In general, in the liver, a decline in activity prevailed. Exposure of chicken to a diet with organic Se (T2) significantly increased AcP, BGAL and HEX activities and reduced BGRD activity ($p \leq 0.01$). As for the activity of aminopeptidases, there was an increase in the activity of all of them. In general, in the liver of chickens in T2, the increase in activity prevailed. In the group of chickens fed a diet with nano-Se (T3), the activities of AcP, BGAL, HEX and all three estimated aminopeptidases increased significantly ($p \leq 0.01$). Only BGRD activity decreased in this group of chickens ($p \leq 0.05$). Overall, an increase in degradative activity prevailed, and changes in enzyme activity followed a similar pattern to the previous group, T2, fed a diet with organic Se. In blood serum, of all the enzymes analysed, only the activity of aminopeptidases changed statistically significantly in all the groups of chickens studied ($p \leq 0.01$). A diet with the upper dose of inorganic Se significantly increased the activity of all aminopeptidases in serum, while feeding a diet with organic Se (T2) and nano-Se (T3) significantly decreased it.

Table 5. Enzymatic activity and antioxidant potential in selected tissues of male broiler chickens.

Indices	Breast Muscle						Group Liver						Serum					
	CON	T1	T2	T3	SEM	<i>p</i> Value	CON	T1	T2	T3	SEM	<i>p</i> Value	CON	T1	T2	T3	SEM	<i>p</i> Value
AlaAP, nmol/mg protein/h	208.64 ^A	171.07 ^A	274.29 ^B	287.73 ^B	11.529	<0.001	265.91 ^A	267.32 ^A	406.13 ^B	467.25 ^B	23.211	0.001	40.12 ^A	46.32 ^A	22.17 ^B	28.91 ^B	2.0630	<0.001
LeuAP, nmol/mg protein/h	132.47 ^A	129.74 ^A	160.09 ^{AB}	189.48 ^B	6.335	<0.001	389.71 ^A	366.43 ^A	407.05 ^{AB}	524.87 ^B	19.878	0.013	48.38 ^{AB}	51.22 ^A	29.40 ^C	40.71 ^B	1.928	<0.001
ArgAP, nmol/mg protein/h	185.15 ^A	172.23 ^A	223.30 ^B	249.21 ^C	6.758	<0.001	319.19 ^A	321.11 ^A	369.28 ^{AB}	414.11 ^B	11.137	0.001	32.06 ^A	34.41 ^A	16.31 ^B	23.45 ^B	1.614	<0.001
AcP, nmol/mg protein/h	1330.75 ^A	1538.31 ^A	1899.71 ^B	2137.26 ^B	71.710	<0.001	1528.39 ^A	1240.78 ^B	1568.14 ^A	1759.12 ^C	42.830	<0.001	31.63	35.69	37.30	30.83	2.795	0.831
BGDR, nmol/mg protein/h	129.17	125.84	129.88	137.27	4.114	0.816	347.44 ^A	427.73 ^B	318.99 ^A	300.51 ^A	13.431	0.001	9.27	9.02	10.55	8.49	1.066	0.926
BGAL, nmol/mg protein/h	429.23 ^b	400.83 ^{ab}	372.47 ^a	391.54 ^{ab}	7.307	0.036	353.88 ^A	357.39 ^A	381.43 ^A	483.94 ^B	14.620	0.001	8.12	9.58	12.02	9.73	0.866	0.477
BGLU, nmol/mg protein/h	237.81 ^{AB}	264.24 ^B	211.54 ^A	237.58 ^{AB}	5.206	0.001	383.20	401.92	380.35	358.56	12.127	0.686	9.39	7.95	10.20	8.00	1.085	0.868
HEX, nmol/mg protein/h	617.80 ^a	692.00 ^{ab}	659.41 ^{ab}	745.95 ^b	17.003	0.042	1064.01 ^{AB}	941.48 ^A	1114.53 ^{AB}	1212.82 ^B	30.675	0.008	58.65	56.58	50.85	52.79	3.913	0.807
aGlu, nmol/mg protein/h	76.24 ^A	71.76 ^A	87.50 ^{AB}	102.46 ^B	3.328	0.001	323.77	240.78	304.10	294.70	12.844	0.093	7.26	6.65	8.22	6.45	0.746	0.852
MAN, nmol/mg protein/h	327.70 ^A	328.87 ^A	287.92 ^B	292.97 ^B	5.160	0.001	381.34	306.85	358.08	372.77	13.256	0.192	6.39	7.73	12.32	8.22	0.984	0.166
Vit. C, mg/100 mL	1.89 ^A	1.80 ^A	4.70 ^B	3.15 ^{AB}	0.323	0.001	2.57 ^{AB}	2.02 ^A	4.16 ^{BC}	4.36 ^C	0.287	0.001	4.46 ^{ab}	3.85 ^b	3.75 ^b	6.73 ^a	0.381	0.011
DPPH, %	52.55 ^{AB}	51.49 ^A	55.83 ^{BC}	56.12 ^C	0.588	0.002	85.53 ^A	85.71 ^{AB}	86.42 ^{BC}	86.56 ^C	0.132	0.004	82.82 ^A	81.84 ^{AB}	74.27 ^{BC}	71.20 ^C	1.369	0.002
GSH mM-SH	0.05 ^A	0.04 ^A	0.20 ^B	0.25 ^B	0.021	<0.001	0.85 ^{AB}	0.71 ^A	0.89 ^B	0.95 ^B	0.026	0.004	0.99 ^A	1.00 ^A	0.98 ^A	1.28 ^B	0.034	0.001

Data are given as mean \pm SEM (n = 10); ^{A, B, C}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$; ^{a, b}—values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.05$; SEM—standard error of mean; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed). AlaAP—alanine aminopeptidase; LeuAP—leucine aminopeptidase; ArgAP—arginineaminopeptidase; AcP—acid phosphatase; BGRD—beta-glucuronidase; BGAL—beta-galactosidase; BGLU—beta-glucosidase; aGlu—alpha-glucosidase; MAN—mannosidase; HEX—N-acetyl-BD-hexosaminidase; vit. C—vitamin C; GSH—glutathione; DPPH—2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

The effect of Se type on the oxidative status in analysed tissues of broiler chickens was tested using the following determinations: vitamin C, glutathione (GSH), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). In the pectoral muscle of chickens fed the upper dose of inorganic Se (T1 group), all indicators decreased, while in fed organic Se (T2 group) and nano-Se (T3), all indicators increased significantly. In the liver, both groups of chickens: T2 and T3, obtained significantly higher vitamin C, DPPH and glutathione results than the group considered a control. In contrast, the T1 group had statistically significantly lower vitamin C and glutathione levels and a higher result for DPPH than the CON group. Analysis of serum antioxidant potential in the T1 group showed a statistically significant reduction in vitamin C and DPPH levels ($p \leq 0.05$), while glutathione level increased ($p \leq 0.05$). Serum levels of all analysed factors decreased in chickens fed a diet supplemented with organic Se. The addition of nano-Se to the diet decreased the levels of vitamin C and GSH and increased the level of DPPH ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

Food can be supplemented with selenium (Se) in various forms, such as inorganic, organic, and nanoparticle forms. The metabolism of these forms is different in birds. The chemical form and concentration of Se have significant roles in the rate of absorption, retention, and metabolism. Most inorganic Se is excreted in the urine, while nano-Se particles are excreted in faeces [46]. It has been shown that the inorganic form of Se has low bioavailability, accelerates oxidation processes and can be toxic, especially at high concentrations. In contrast, organic-Se and nano-Se exhibit low toxicity, high adsorption capacity, high bioavailability and high catalytic efficiency in chickens, sheep and goats [46–48]. Selenium is an important trace element that upregulates a vital component of the antioxidant defence mechanism by controlling the body's glutathione pool and Se-dependent antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase [49,50]. These enzymes can help in reducing the concentration of hydrogen peroxide and lipid peroxides and enhance the immune response in numerous species of animals [51]. Several studies have illustrated that the dietary Se form influences growth performance, meat quality characteristics and antioxidative properties in chickens [52,53].

Based on the study, the different forms of Se in the feed at an increased dose (0.5 mg/kg) were not found to negatively affect the growth performance of the chickens. Our results showed that the addition of nanoparticle Se did not adversely impact the growth performance of chickens, indicating that nano-Se has high bioavailability and low toxicity compared to inorganic forms of Se such as SS [54]. The results obtained in this study are consistent with those of Yoon et al. [55], which found that the source of Se in the feed did not affect the growth performance of chickens. In contrast, groups of chickens fed a lower dose of 0.2 mg/kg of dietary organic Se or nano-Se had similar growth performance compared to a group supplemented with the same level of Se in the form of selenite [56]. In a study by Ahmad et al. [36], it was found that the application of increased Se intake (0.4 mg/kg feed) in the SY form and nano-Se was able to cover the requirement of this element by the birds and provide optimal growth conditions with no differences between the application of SY and nano-Se. There are known reports where Se influences the growth performance of birds, which is related to the expression of selenoprotein P and type I selenoenzymes, which play a key role in the synthesis of thyroid hormones and Se transport, both of which contribute to the proper functioning and growth of avian organisms [57].

The use of different sources of Se at an increased dose, as in the case of chicken growth performance, had no significant effect ($p \geq 0.05$) on the slaughter analysis results of cockerels at day 42 of rearing. Higher slaughter and BM performance was found in broilers that received SY in the feed. In contrast, Payne and Southern [58], in an experiment conducted on chickens receiving SS and SY, found that slaughter performance was not dependent on the form of Se in the feed. Downs et al. [52,58] found a similar relationship in their study on the use of SY in broiler feeding. The non-significant difference in body weight

and other slaughter parameters in the present study may be due to feeding a balanced diet with appropriate practice [59] and optimal microclimate conditions with the welfare of the birds unaffected by, among other things, heat stress or other factors that may negatively affect the rearing performance of the chickens.

The highest concentration of Se was found in the BM of T2 cockerels, whereas the highest concentration of Se was found in the liver of the T1 group (SS, 0.5 mg/kg). This result is different from what was reported in [60]. Studies have indicated that nano-Se has a higher bioavailability and a lower risk of toxicity than other forms of Se [61]. Based on the results of the present study, it seems reasonable to recommend that broilers take nano-Se at a dose of 0.3–0.5 mg/kg [22]. The organic form of Se is accumulated to a greater extent than the inorganic form [62,63]; presumably, this may be related to differences in metabolic pathways between the inorganic and organic forms of Se. Inorganic Se is absorbed through the intestine through a passive diffusion process, with organic Se through an active transport mechanism [62]. A final product with increased nutritional value can be achieved by adequate supplementation of nano-Se at an increased dose (0.5 mg/kg). Our study confirms that nano-Se and liver enriched with nano-Se in this way are safe and can provide a valuable source of Se [34].

The post-mortem transformation of chicken muscle leads to an accumulation of lactic acid, which directly leads to a reduction in tissue pH. The delayed reduction in pH post-mortem results in reduced protein denaturation, which translates into an improved ability of skeletal muscle to retain its own water [64]. In the present study, a significant effect of Se application at an increased dose on pH₂₄ was found. BM of cockerels in which SS was used in the diet at a dose of 0.5 mg/kg feed had the lowest pH₂₄ and thus higher drip loss (3.01) and WHC (3.11), while the differences between CON, SY and nano-Se were not significant. This helps to conclude that the use of other forms of Se in chicken feed versus SS at an increased ration has a positive effect on the physico-chemical properties related to water retention in BM. Meat colour is dependent on a number of factors, including pH, myoglobin concentration, nitrite, etc. [65]. Se can significantly improve serum glutathione peroxidase activity, increase the resistance to oxidation of myoglobin or oxymyoglobin, among others, and deepen the colour of meat [22,66]. In this study, an increased dose of Se SS increases lightness (L*) and yellowness (b*), which directly affect the consumer's visual assessment of the pectoral muscle (ΔE).

Ultrastructural studies conducted showed the most significant changes in the muscle fibres of broiler chickens after supplementation of the inorganic Se at a dose of 0.5 mg/kg diet (Figure 2C,D). We showed a change in the profile of myofibrils and damage to sarcomeres and mitochondria. Furthermore, measurements of sarcomere size showed a reduction in length to 1.64 μm , which may suggest reduced elasticity of muscle tissue. This may be due to the weaker uptake of Se, which is more difficult to bind to glutathione peroxidase, which is responsible for scavenging oxygen free radicals and preventing oxidative stress [67–69]. In contrast, chickens that were fed Se in organic form (T2) and Se in nano form (T3) showed a slightly different picture of ultrastructural changes (Figure 2E–H). In this case, a stable structure of myofibrils with sarcomeres with a regular profile of actin and myosin fibres was demonstrated. No significant changes in mitochondrial structure were shown. However, measurements of the size of the sarcomeres showed an increase in length to 1.79 μm after organic Se (T2), and an increase to 1.81 μm after nanoparticles, the opposite of the group receiving inorganic Se. According to data [70], the length of sarcomeres can influence the better elasticity of muscle tissue and thus the quality of broiler chicken meat. To reveal the effect of different sources of Se supplementation on the ultrastructure of hepatocytes, the ultra-thin sections of the liver of chicken from all experimental groups (CON, T1, T2, T3) were also analysed by transmission electron microscopy (TEM). Our research has shown that the primary effect of Se at the ultrastructural level of the liver was the appearance of clusters of electron-dense (osmiophilic) inclusions within the mitochondrial matrix. However, these pathological changes were mainly observed in the hepatocytes of the chickens from the T1 group (Figure 4C,D) and to a minor extent in

the mitochondria of the chickens fed the recommended diet containing SS at the level of 0.3 mg/kg feed (Figure 4A,B). Inclusions were not observed in the hepatocytes of chickens (T1) of the other groups, T2 and T3. In addition, almost all mitochondria in hepatocytes of chickens from the T1 group exhibit varying degrees of hydropic degeneration. They were swollen and had damaged inner membranes, including a high degree of cristae disorganization. The inclusions mentioned early on were found in the mitochondrial matrix that was transparent due to the influx of water. Abundant, spherical shape electron-dense deposits in the mitochondrial matrix were seen in numerous mitochondria of chicken fed with the upper dose of inorganic Se (Figure 4D). Abnormal mitochondria represent 91.83% of the total amount (Figure 5). In our opinion, hepatocyte mitochondria of chicken from the T1 group show features of a toxic response to excess inorganic Se in the feed. The effect of changes in the matrix volume in the physiological range is to stimulate the electron transfer chain and oxidative phosphorylation in order to satisfy the metabolic requirements of the cell. However, excessive matrix swelling caused by the continued opening of mitochondrial permeability transition pores (*p*TP) and other PTP-independent mechanisms makes mitochondrial function and integrity less efficient and leads to cell death [71]. Similar observations regarding the accumulation of electron-dense inclusions in the mitochondrial matrix were made by Medina et al. [72], who studied the effects of Se (Na_2SeO_3 ; SS) on the growth of three cell lines cultured in vitro. They performed analyses by transmission electron microscopy to determine any ultrastructural changes which correlated with the effects of Se treatment. They observed that the vast majority of the mitochondrial matrices were filled with dense osmophilic deposits. The accumulation was dependent on the dose of Se in the culture medium, the time of exposure, and the cell line. However, Se did not alter cytoplasmic microtubules or intermediate filament networks because they obtained abundant desmosomes [72]. Furthermore, they examined the chemical nature of the electron-dense material in the mitochondrial matrix by X-ray microanalysis of sections of studied cells. They obtained, as a result, an increased level of calcium, iron, and Se in the mitochondrial matrix [72]. There was some speculation about the nature of the material accumulated, as the nature of the mitochondrial inclusion was generally unknown, although it could be protein complexed by Se since Se reacts easily with mercapto groups of organic compounds [72,73]. Medina et al. [72] suggested that whereas high doses of Se inhibit the growth of cells, low doses stimulate the growth of some cell populations. They speculated that one of the early reasons of Se-mediated growth inhibition may be a modulation of mitochondrial function [72]. Klug et al. [73] found that succinic dehydrogenase was inhibited in vivo by sodium selenite. Liu et al. [74] used TEM to detect the accumulation of lentinan (LNT)-functionalized nano-Se in the mitochondria of tumour cells, and furthermore, they investigated the mechanism of selenite targeting mitochondria. Analysis of ultra-thin sections showed that Se enters the cells through the caveolae-mediated endocytosis pathway and then enters the mitochondria via mitochondrial membrane fusion [74]. Zahedi et al. [75] analysed the effects of Se tetrachloride (SeCl_4) on the mitochondria of lung A549 cells. Analysis of mitochondrial morphology showed a significant increase in the swollen phenotype and a decrease in mitochondrial motility in Se treated cells [75]. Furthermore, they performed double staining of the cells with autophagy marker GFP-LC3 and MitoTracker. The results of this staining showed that the swollen mitochondria co-labeled with autophagosomes, indicating their targeted degradation via mitophagy [75]. Noteworthy in our study is the simultaneous appearance of damaged mitochondria and autophagic vacuoles, as well as a reduction in the number of primary lysosomes in hepatocytes of chickens treated with a high dose of inorganic Se (T1). In hepatocytes from chickens fed the upper dose of organic Se (T2) and nano-Se (T3), in contrast to the T2 group, only some mitochondria were swollen and had damaged cristae (accounting for 25.43% and 26.96% of the total amount in the cell, respectively). In contrast, numerous primary lysosomes appeared (Figure 4F). Overall, in the groups of chickens (CON, T2 and T3), in contrast to the T1 group, no significant pathological changes

were observed in the ultrastructure of hepatocytes, either with respect to mitochondria or other organelles.

Parallel to morphological analysis, the activity of degradative enzymes was estimated. Morphological images correlate with the results of degradative enzyme activity (Table 5). In the liver of chickens exposed to a diet with an upper dose of inorganic Se, a decrease in the activity of the analysed enzymes prevailed. This indicates that the enzymes were involved in intracellular digestion processes, as evidenced by the presence of autophagic vacuoles and depletion of primary lysosomes, which are a cellular reservoir of acid hydrolases (Figure 4C,D). In contrast, an increase in the activity of the analysed enzymes in the liver prevailed in the other two groups of chickens (exposed to a diet with organic Se—T2, and nano-Se—T3), indicating a reduction in the level of lysosomal degradation. The ultrastructure of hepatocytes of both groups showed numerous primary lysosomes, presumably due to low lysosome consumption. The decrease in enzyme activity in the T1 group may indicate an increase in the degradation of organelles damaged by an excessive dietary supply of inorganic Se. According to Marzella et al. [76], initially, the enzyme activity increases in parallel with the induction of degradation, but it later decreases with the advanced stage of the sequestered cell organelle degradation [77,78]. With more advanced stages of lysosomal degradation, the activity seems to decline due to enzyme reserves consumption [76,77] and possibly insufficient synthesis. According to Kalamida et al. [79], the increase in lysosome accumulation, presumably due to a low rate of lysosome consumption, is accompanied by an increase in cathepsin D expression. Zahedi et al. [75], analysing the effects of Se tetrachloride on the mitochondria of lung A549 cells, obtained a significant dose-dependent increase in mitochondrial protein oxidation [75]. Several research teams confirm that Se (SS, seleno-lentinan-functionalized, nano-Se) has been implicated in mitochondrial toxicity, with reactive oxygen species playing an important role [74,75,80,81]. They confirmed that after Se treatment, mitochondria become the main organelles of ROS production. Sun et al. [81] showed that excessive Se can enhance the toxicity of other metals (such as arsenic) by reacting with S-adenosylmethionine and glutathione. Mitochondria are very dynamic structures and have been used to study a variety of biological problems such as stress and drug response [75]. Environmental toxicants can have a negative impact on mitochondria and alter their morphology [75,82]. It is well known that mitochondrial dysfunction is a prominent phenomenon in the pathogenesis of a variety of diseases. In summary, mitochondria appear to be the main targets of the upper dose of Se, and changes in the structure and function of this organelle are commonly observed in Se-treated cells [72,74,75,83].

The influence of Se on the oxidative status in the analysed tissues of broiler chickens was tested using the following determinations: vitamin C, glutathione (GSH), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Both groups of chickens in T2 and T3 obtained significantly higher vitamin C, DPPH and glutathione results in muscle and liver tissues than in the group considered a control. In contrast, group T1 obtained significantly lower results in these tissues. The increase in the levels of antioxidant indicators in the muscle and liver tissues of chickens from the T2 and T3 groups indicates better oxidative stability of the organism, in contrast to the T1 group, where we obtained lower parameters. Visha et al. [84] obtained very similar results; namely, birds supplemented with the nano- and organic Se showed higher total antioxidant capacity in the serum and tissues compared to the inorganic Se supplemented group. Se is known to play an essential role in protecting cells from oxidative damage by affecting the antioxidant levels and activities of selenoenzymes [85]. Nano-Se is capable of scavenging free radicals by improving the activity of seleno-enzymes [85,86] and growth improvement along with the status of serum oxidants and retention of selenium in vivo. In comparison with other selenium species such as SeMet, SeCys, and SY, nano-Se showed lower acute toxicity but increased the activities of selenoenzymes. The antioxidant effect of nano-Se is mainly associated with glutathione peroxidase family (GPXs) and thioredoxin reductase (TR). The GPXs have a capacity to detoxify an extended range of peroxides, such as H₂O₂, phospholipid hydroperoxide, fatty acid hydroperoxides, and hydroperoxyl groups of thymine [87]. In conclusion, the study

concluded that the use of nano-Se in the diet can be effective in increasing the antioxidant potential in the organisms of chickens, thereby increasing the ability to detoxify a wide range of peroxides.

5. Conclusions

Based on this study, the use of different forms of Se in broiler chicken diet besides commonly used sodium selenate had a positive effect on the physico-chemical properties of the breast muscle and on the health status, antioxidant potential and ultrastructure of the breast muscle and liver. It also improved quality parameters of the pectoral muscle, such as the length of the sarcomeres, which resulted in better elasticity of the muscle tissue and thus in meat quality. In addition, the use of nano-Se at an increased dose was confirmed to protect against mitochondrial damage in hepatocytes and increased antioxidant potential. Nano-Se did not show degenerative and toxic effects similar to sodium selenite at a dose of 0.5 mg/kg feed. The use of nano-Se at a dose higher than the recommended dose had high bioavailability and low toxicity without negatively affecting the growth performance of chickens.

Author Contributions: D.B., M.M. and P.K. conceived the project idea, designed the study and supervised the project. D.B., M.M. and A.M. performed the experiments. D.B., M.M., M.Ł.-G., A.J., A.W., A.M., M.K. and P.K. performed the laboratory work. D.B., M.M., M.Ł.-G., A.W. and P.K. analysed the data and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, grant no. 2018/29/B/NZ9/01351 “Bioactivity of cannabidiol and nano-selenium in the maintenance of gut immunological and integrity potential in chickens”.

Institutional Review Board Statement: All procedures in the present study were performed in accordance with the principles of the European Union and Polish Law on Animal Protection. No action involving pain or suffering was practiced. The study was carried out in compliance with the Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. All applicable institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The experimental procedures carried out in this study were approved by the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Warsaw University of Life Sciences (Ciszewskiego Str. 8, 02-786 Warsaw, Poland). Ethical review and approval were waived for this study; as a result, the activities undertaken on the animals in the project are typical zootechnical activities (evaluation of the effects of different forms of selenium as a feed additive in the feeding of broiler chickens), which do not fulfil the definition of a procedure (the animals will be maintained under standard environmental conditions and will not be subjected to any vital procedures). Considering the above, it must be considered that the planned research does not go beyond the standard husbandry and rearing of animals for agricultural operations. On this basis, the planned study design was considered not to require ethics committee approval for the experiment (1 September 2021, the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Warsaw University of Life Sciences).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are contained within the article.

Acknowledgments: The manuscript is a part of the thesis of Damian Bień.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yildiz, A.; Kaya, Y.; Tanriverdi, O. Effect of the interaction between selenium and zinc on dna repair in association with cancer prevention. *J. Cancer Prev.* **2019**, *24*, 146–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Castets, P.; Bertrand, A.T.; Beuvin, M.; Ferry, A.; Le Grand, F.; Castets, M.; Chazot, G.; Rederstorff, M.; Krol, A.; Lescure, A.; et al. Satellite cell loss and impaired muscle regeneration in selenoprotein N deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 694–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dudkiewicz, M.; Szczepińska, T.; Grynberg, M.; Pawłowski, K. A novel protein kinase-like domain in a selenoprotein, widespread in the tree of life. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 32138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Sun, L.H.; Huang, J.Q.; Deng, J.; Lei, X.G. Avian selenome: Response to dietary Se and Vitamin E deficiency and supplementation. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 4247–4254. [[CrossRef](#)]
5. Surai, P.F.; Kochish, I.I.; Fisinin, V.I.; Velichko, O.A. Selenium in poultry nutrition: From sodium selenite to organic selenium sources. *J. Poult. Sci.* **2018**, *55*, 79–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. LeBlanc, K.L.; Kumkrong, P.; Mercier, P.H.J.; Mester, Z. Selenium analysis in waters. Part 2: Speciation methods. *Sci. Total Environ.* **2018**, *640–641*, 1635–1651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Di Marzio, A.; Lambertucci, S.A.; Fernandez, A.J.G.; Martínez-López, E. From Mexico to the Beagle Channel: A review of metal and metalloid pollution studies on wildlife species in Latin America. *Environ. Res.* **2019**, *176*, 108462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. PAUL, T.; SAHA, N.C. Environmental Arsenic and Selenium Contamination and Approaches Towards Its Bioremediation Through the Exploration of Microbial Adaptations: A Review. *Pedosphere* **2019**, *29*, 554–568. [[CrossRef](#)]
9. Etteieb, S.; Magdouli, S.; Zolfaghari, M.; Brar, S.K. Monitoring and analysis of selenium as an emerging contaminant in mining industry: A critical review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *698*, 134339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Minuye, A.; Zewge, F.; Chandravanshi, B.S. Levels of selenium in selected river, well and bottled waters in Ethiopia by microwave plasma-atomic emission spectrometry. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2020**, *34*, 215–226. [[CrossRef](#)]
11. Gammelgaard, B.; Rasmussen, L.H.; Gabel-Jensen, C.; Steffansen, B. Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by in vitro flux and biotransformation studies in Caco-2 cells and ICP-MS detection. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *145*, 248–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Han, X.J.; Qin, P.; Li, W.X.; Ma, Q.G.; Ji, C.; Zhang, J.Y.; Zhao, L.H. Effect of sodium selenite and selenium yeast on performance, egg quality, antioxidant capacity, and selenium deposition of laying hens. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 3973–3980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schweizer, U.; Streckfuß, F.; Pelt, P.; Carlson, B.A.; Hatfield, D.L.; Köhrle, J.; Schomburg, L. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 221–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yu, L.L.; Wang, R.L.; Zhang, Y.Z.; Kleemann, D.O.; Zhu, X.P.; Jia, Z.H. Effects of selenium supplementation on polyunsaturated fatty acid concentrations and antioxidant status in plasma and liver of lambs fed linseed oil or sunflower oil diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *140*, 39–51. [[CrossRef](#)]
15. Schäfer, K.; Kyriakopoulos, A.; Gessner, H.; Grune, T.; Behne, D. Effects of selenium deficiency on fatty acid metabolism in rats fed fish oil-enriched diets. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2004**, *18*, 89–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zanini, S.F.; Torres, C.A.A.; Bragagnolo, N.; Turatti, J.M.; Silva, M.G.; Zanini, M.S. Effect of oil sources and vitamin E levels in the diet on the composition of fatty acids in rooster thigh and chest meat. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 672–682. [[CrossRef](#)]
17. González, E.; Tejada, J.F. Effects of dietary incorporation of different antioxidant extracts and free-range rearing on fatty acid composition and lipid oxidation of Iberian pig meat. *Animal* **2007**, *1*, 1060–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Netto, A.S.; Zanetti, M.A.; Del Claro, G.R.; De Melo, M.P.; Vilela, F.G.; Correa, L.B. Effects of copper and selenium supplementation on performance and lipid metabolism in confined brangus bulls. *Asian Australasian J. Anim. Sci.* **2014**, *27*, 488–494. [[CrossRef](#)]
19. Pereira, A.S.C.; dos Santos, M.V.; Aferri, G.; Corte, R.R.P.D.S.; Silva, S.D.L.; Freitas Júnior, J.E.D.; Leme, P.R.; Rennó, F.P. Lipid and selenium sources on fatty acid composition of intramuscular fat and muscle selenium concentration of Nellore steers. *Rev. Bras. Zootec.* **2012**, *41*, 2357–2363. [[CrossRef](#)]
20. Ali, A.A. Use of nano-calcium and phosphors in broiler feeding. *Egypt. Poult. Sci. J.* **2017**, *37*, 637–650.
21. Habibian, M.; Sadeghi, G.; Ghazi, S.; Moeini, M.M. Selenium as a Feed Supplement for Heat-Stressed Poultry: A Review. *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *165*, 183–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cai, S.J.; Wu, C.X.; Gong, L.M.; Song, T.; Wu, H.; Zhang, L.Y. Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2532–2539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cemin, H.S.; Vieira, S.L.; Stefanello, C.; Kindlein, L.; Ferreira, T.Z.; Fireman, A.K. Broiler responses to increasing selenium supplementation using Zn-L-selenomethionine with special attention to breast myopathies. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 1832–1840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ramiah, S.K.; Awad, E.A.; Mookiah, S.; Idrus, Z. Effects of zinc oxide nanoparticles on growth performance and concentrations of malondialdehyde, zinc in tissues, and corticosterone in broiler chickens under heat stress conditions. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 3828–3838. [[CrossRef](#)]
25. Patra, A.; Lalhriatpuii, M. Progress and Prospect of Essential Mineral Nanoparticles in Poultry Nutrition and Feeding—a Review. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *197*, 233–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Khurana, A.; Tekula, S.; Saifi, M.A.; Venkatesh, P.; Godugu, C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 802–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guan, B.; Yan, R.; Li, R.; Zhang, X. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 7473–7490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Skalickova, S.; Fernandez, C.; Ruttkay-Nedecky, B.; Peng, Q.; Baron, M.; Melcova, M.; Opatrilova, R.; Zidkova, J.; et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: A critical review. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2107–2128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Skalickova, S.; Milosavljevic, V.; Cihalova, K.; Horoky, P.; Richtera, L.; Adam, V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* **2017**, *33*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Griffin, S.; Masood, M.I.; Nasim, M.J.; Sarfraz, M.; Ebokaiwe, A.P.; Schäfer, K.H.; Keck, C.M.; Jacob, C. Natural nanoparticles: A particular matter inspired by nature. *Antioxidants* **2018**, *7*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Pelyhe, C.; Mézes, M. Myths and Facts About the Effects of Nano- Selenium in Farm Animals—Mini-Review. *Eur. Chem. Bull.* **2013**, *2*, 1049–1052. [[CrossRef](#)]
32. Mohapatra, P.; Swain, R.K.; Mishra, S.K.; Behera, T.; Swain, P.; Behura, N.C.; Sahoo, G.; Sethy, K.; Bhol, B.P.; Dhama, K. Effects of dietary nano-selenium supplementation on the performance of layer grower birds. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* **2014**, *9*, 641–652. [[CrossRef](#)]
33. Hu, C.H.; Li, Y.L.; Xiong, L.; Zhang, H.M.; Song, J.; Xia, M.S. Comparative effects of nano elemental selenium and sodium selenite on selenium retention in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *177*, 204–210. [[CrossRef](#)]
34. Bień, D.; Michalczyk, M.; Szkopek, D.; Kinsner, M.; Konieczka, P. Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 13817. [[CrossRef](#)]
35. Surai, P.F.; Kochish, I.I. Food for thought: Nano-selenium in poultry nutrition and health. *Anim. Health Res. Rev.* **2020**, *21*, 103–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ahmad, H.; Tian, J.; Wang, J.; Khan, M.A.; Wang, Y.; Zhang, L.; Wang, T. Effects of dietary sodium selenite and selenium yeast on antioxidant enzyme activities and oxidative stability of chicken breast meat. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7111–7120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Michalczyk, M.; Jóźwik, A.; Damaziak, K.; Zdanowska-Sasiadek, Z.; Marzec, A.; Gozdowski, D.; Strzałkowska, N. Age-related changes in the growth performance, meat quality, and oxidative processes in breast muscles of three chicken genotypes. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* **2016**, *40*, 389–398. [[CrossRef](#)]
38. Michalczyk, M.; Zdanowska-Sasiadek, Z.; Damaziak, K.; Niemiec, J. Influence of indoor and outdoor systems on meat quality of slow-growing chickens. *CYTA J. Food* **2017**, *15*, 15–20. [[CrossRef](#)]
39. Bendowski, W.; Michalczyk, M.; Jóźwik, A.; Kareem, K.Y.; Łozicki, A.; Karwacki, J.; Bień, D. Using Milk Thistle (*Silybum marianum*) Extract to Improve the Welfare, Growth Performance and Meat Quality of Broiler Chicken. *Animals* **2022**, *12*, 1085. [[CrossRef](#)]
40. McDonald, J.K.; Barrett, A.J. Mammalian Proteinases: A Glossary and Bibliography Volume 2 Exopeptidases. *Biochem. Biol. Plasma Lipoproteins* **1987**, *224*, 235–236.
41. Barrett, A.J.; Heath, M.F. Lysosomal enzymes. In *Lysosomes. A Laboratory Handbook*; Dingle, J.T., Ed.; North-Holland Publ. Co.: Amsterdam, The Netherlands, 1972; pp. 19–135.
42. Michalczyk, M.; Holl, E.; Möddel, A.; Jóźwik, A.; Słószarz, J.; Bień, D.; Zabek, K.; Konieczka, P. Phytogetic ingredients from hops and organic acids improve selected indices of welfare, health status markers, and bacteria composition in the caeca of broiler chickens. *Animals* **2021**, *11*, 3249. [[CrossRef](#)]
43. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
44. Marzella, L.; Glaumann, H. Increased degradation in rat liver induced by vinblastine. I. Biochemical characterization. *Lab. Investig.* **1980**, *42*, 8–17.
45. *Aviagen Ross 308: Broiler Performance Objectives*; Aviagen Inc.: Huntsville, AL, USA, 2019; pp. 1–15.
46. Saleh, A.A.; Ebeid, T.A. Feeding sodium selenite and nano-selenium stimulates growth and oxidation resistance in broilers. *S. African J. Anim. Sci.* **2019**, *49*, 176–183. [[CrossRef](#)]
47. Toś-Luty, S.; Obuchowska-Przebirowska, D.; Latuszzyńska, J.; Musik, I.; Tokarska-Rodak, M. Comparison of histological and ultrastructural changes in mice organs after supplementation with inorganic and organic selenium. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2003**, *10*, 87–91. [[PubMed](#)]
48. Pedro, D.; Rosa, A.P.; Londero, A.; Forgiarini, J.; Branco, T.; De Freitas, H.M.; Giacomini, C.B.S.; Pilecco, M. Performance of broiler breeders supplemented with organic and inorganic minerals. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2021**, *93*, e20191048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Albanes, D.; Till, C.; Klein, E.A.; Goodman, P.J.; Mondul, A.M.; Weinstein, S.J.; Taylor, P.R.; Parnes, H.L.; Gaziano, J.M.; Song, X.; et al. Plasma tocopherols and risk of prostate cancer in the Selenium and Vitamin e Cancer Prevention Trial (SELECT). *Cancer Prev. Res.* **2014**, *7*, 886–895. [[CrossRef](#)]
50. Shaheen, S.M.; Rinklebe, J.; Frohne, T.; White, J.R.; DeLaune, R.D. Biogeochemical Factors Governing Cobalt, Nickel, Selenium, and Vanadium Dynamics in Periodically Flooded Egyptian North Nile Delta Rice Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2014**, *78*, 1065–1078. [[CrossRef](#)]
51. Li, J.L.; Zhang, L.; Yang, Z.Y.; Zhang, Z.Y.; Jiang, Y.; Gao, F.; Zhou, G.H. Effects of Different Selenium Sources on Growth Performance, Antioxidant Capacity and Meat Quality of Local Chinese Subei Chickens. *Biol. Trace Elem. Res.* **2018**, *181*, 340–346. [[CrossRef](#)]
52. Downs, K.M.; Hess, J.B.; Bilgili, S.F. Selenium Source Effect on Broiler Carcass Characteristics, Meat Quality and Drip Loss. *J. Appl. Anim. Res.* **2000**, *18*, 61–72. [[CrossRef](#)]
53. Marković, R.; Glišić, M.; Bošković, M.; Baltić, M. New scientific challenges—The possibilities of using selenium in poultry nutrition and impact on meat quality. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2017**, *85*, 12032. [[CrossRef](#)]
54. Ibrahim, D.; Kishawy, A.T.Y.; Khater, S.I.; Arisha, A.H.; Mohammed, H.A.; Abdelaziz, A.S.; Abd El-Rahman, G.I.; Elabbasy, M.T. Effect of dietary modulation of selenium form and level on performance, tissue retention, quality of frozen stored meat and gene expression of antioxidant status in ross broiler chickens. *Animals* **2019**, *9*, 342. [[CrossRef](#)]
55. Yoon, I.; Werner, T.M.; Butler, J.M. Effect of source and concentration of selenium on growth performance and selenium retention in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 727–730. [[CrossRef](#)]

56. Couloigner, F.; Jllali, M.; Briens, M.; Rouffineau, F.; Geraert, P.A.; Mercier, Y. Selenium deposition kinetics of different selenium sources in muscle and feathers of broilers. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2708–2714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zhan, X.A.; Wang, H.F.; Yuan, D.; Wang, Y.; Zhu, F. Comparison of different forms of dietary selenium supplementation on gene expression of cytoplasmic thioredoxin reductase, selenoprotein P, and selenoprotein W in broilers. *Czech J. Anim. Sci.* **2014**, *59*, 571–578. [[CrossRef](#)]
58. Payne, R.L.; Southern, L.L. Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 898–902. [[CrossRef](#)]
59. Rama Rao, S.V.; Prakash, B.; Raju, M.V.L.N.; Panda, A.K.; Poonam, S.; Murthy, O.K. Effect of supplementing organic selenium on performance, carcass traits, oxidative parameters and immune responses in commercial broiler chickens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2013**, *26*, 247–252. [[CrossRef](#)]
60. Chen, K.; Fang, J.; Peng, X.; Cui, H.; Chen, J.; Wang, F.; Chen, Z.; Zuo, Z.; Deng, J.; Lai, W.; et al. Effect of selenium supplementation on aflatoxin B1-induced histopathological lesions and apoptosis in bursa of Fabricius in broilers. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *74*, 91–97. [[CrossRef](#)]
61. Zhan, X.A.; Wang, M.; Zhao, R.Q.; Li, W.F.; Xu, Z.R. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *132*, 202–211. [[CrossRef](#)]
62. Skřivan, M.; Marounek, M.; Dlouhá, G.; Ševčíková, S. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *Br. Poult. Sci.* **2008**, *49*, 482–486. [[CrossRef](#)]
63. Sevcikova, S.; Skřivan, M.; Dlouhá, G.; Koucký, M. The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. *Czech J. Anim. Sci.* **2006**, *51*, 449–457. [[CrossRef](#)]
64. Berri, C.; Le Bihan-Duval, E.; Debut, M.; Santé-Lhoutellier, V.; Baéza, E.; Gigaud, V.; Jégo, Y.; Duclos, M.J. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 2005–2011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. King, N.J.; Whyte, R. Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, R31–R40. [[CrossRef](#)]
66. Oliveira, T.F.B.; Rivera, D.F.R.; Mesquita, F.R.; Braga, H.; Ramos, E.M.; Bertechini, A.G. Effect of different sources and levels of selenium on performance, meat quality, and tissue characteristics of broilers. *J. Appl. Poult. Res.* **2014**, *1*, 15–22. [[CrossRef](#)]
67. Zhang, S.; Xie, Y.; Li, M.; Yang, H.; Li, S.; Li, J.; Xu, Q.; Yang, W.; Jiang, S. Effects of different selenium sources on meat quality and shelf life of fattening pigs. *Animals* **2020**, *10*, 615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Liu, B.; Xiong, Y.L.; Jiang, J.; Yu, D.; Lin, G. Cellular antioxidant mechanism of selenium-enriched yeast diets in the protection of meat quality of heat-stressed hens. *Food Biosci.* **2021**, *39*, 100798. [[CrossRef](#)]
69. Huang, J.C.; Huang, M.; Yang, J.; Wang, P.; Xu, X.L.; Zhou, G.H. The effects of electrical stunning methods on broiler meat quality: Effect on stress, glycolysis, water distribution, and myofibrillar ultrastructures. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 2087–2095. [[CrossRef](#)]
70. Ertbjerg, P.; Puolanne, E. Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. *Meat Sci.* **2017**, *132*, 139–152. [[CrossRef](#)]
71. Javadov, S.; Chapa-Dubocq, X.; Makarov, V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion* **2018**, *38*, 58–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Medina, D.; Asch, B.B.; Oborn, C.J. Mitochondrial Inclusions in Selenium-Treated Mouse Mammary Epithelial Cell Lines. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 2100–2105.
73. Klug, H.L.; Moxon, A.L.; Petersen, D.F.; Painter, E.P. Inhibition of rat liver succinic dehydrogenase by selenium compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *108*, 437–441.
74. Liu, H.J.; Qin, Y.; Zhao, Z.H.; Zhang, Y.; Yang, J.H.; Zhai, D.H.; Cui, F.; Luo, C.; Lu, M.X.; Liu, P.P.; et al. Lentian-functionalized selenium nanoparticles target tumor cell mitochondria via TLR4/TRAF3/MFN1 pathway. *Theranostics* **2020**, *10*, 9083–9099. [[CrossRef](#)]
75. Zahedi, A.; On, V.; Phandthong, R.; Chaili, A.; Remark, G.; Bhanu, B.; Talbot, P. Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16354. [[CrossRef](#)]
76. Marzella, L.; Ahlberg, J.; Glaumann, H. Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: Morphological and biochemical characterization. *J. Cell Biol.* **1982**, *93*, 44–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Wieczorek, A.; Lysek-Gladysinska, M.; Walaszczyk, A.; Jelonek, K.; Smolarz, M.; Pietrowska, M.; Gabrys, D.; Kulik, R.; Widlak, P. Changes in activity and structure of lysosomes from liver of mouse irradiated in vivo. *Int. J. Radiat. Biol.* **2018**, *94*, 443–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lysek-Gladysinska, M.; Wieczorek, A.; Walaszczyk, A.; Jelonek, K.; Jozwik, A.; Pietrowska, M.; Dörr, W.; Gabrys, D.; Widlak, P. Long-term effects of low-dose mouse liver irradiation involve ultrastructural and biochemical changes in hepatocytes that depend on lipid metabolism. *Radiat. Environ. Biophys.* **2018**, *57*, 123–132. [[CrossRef](#)]
79. Kalamida, D.; Karagounis, I.V.; Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M.I. Important role of autophagy in endothelial cell response to ionizing radiation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Selvaraj, V.; Tomblin, J.; Yeager Armistead, M.; Murray, E. Selenium (sodium selenite) causes cytotoxicity and apoptotic mediated cell death in PLHC-1 fish cell line through DNA and mitochondrial membrane potential damage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *87*, 80–88. [[CrossRef](#)]

81. Sun, H.; Rathinasabapathi, B.; Wu, B.; Luo, J.; Pu, L.P.; Ma, L.Q. Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environ. Int.* **2014**, *69*, 148–158. [[CrossRef](#)]
82. Meyer, J.N.; Leung, M.C.K.; Rooney, J.P.; Sandoel, A.; Hengartner, M.O.; Kisby, G.E.; Bess, A.S. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol. Sci.* **2013**, *134*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wang, G.; Guo, Y.; Yang, G.; Yang, L.; Ma, X.; Wang, K.; Zhu, L.; Sun, J.; Wang, X.; Zhang, H. Mitochondria-Mediated Protein Regulation Mechanism of Polymorphs-Dependent Inhibition of Nanoselenium on Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Visha, P.; Nanjappan, K.; Selvaraj, P.; Jayachandran, S.; Thavasiappan, V. Influence of Dietary Nanoselenium Supplementation on the Meat Characteristics of Broiler Chickens. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 340–347. [[CrossRef](#)]
85. Bai, K.; Hong, B.; Hong, Z.; Sun, J.; Wang, C. Selenium nanoparticles-loaded chitosan/citrate complex and its protection against oxidative stress in d-galactose-induced aging mice. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, 92. [[CrossRef](#)]
86. Sarkar, J.; Dey, P.; Saha, S.; Acharya, K. Mycosynthesis of selenium nanoparticles. *Micro Nano Lett.* **2011**, *6*, 599–602. [[CrossRef](#)]
87. Kondaparthi, P.; Flora, S.; Naqvi, S. Selenium nanoparticles: An insight on its Pro-oxidant and antioxidant properties. *Front. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *6*, 1–5. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



OPEN

Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens

Damian Bień^{1✉}, Monika Michalczyk^{1✉}, Dominika Szkopek², Misza Kinsner² & Paweł Konieczka^{2,3}

Selenium is an essential element that is important for many metabolic processes. Feed components used in chicken nutrition, especially cereals, may be deficient in selenium, hence selenium supplementation is necessary. Taking into account the progress in breeding, and thus the higher demand of birds for this element, it seems obvious to investigate an increased selenium dose in the diet of chickens. The aim of the study was to evaluate the effect of feed enriched with different forms of selenium at an increased dose of 0.5 mg/kg feed on the profile and metabolism of fatty acids in the breast muscle and liver of chickens. The study was conducted on 300 Ross 308 chickens reared for 42 days under standard conditions. The control group received feed supplemented with sodium selenite at a dose of 0.3 mg/kg feed. The research groups received different forms of selenium (sodium selenate, selenised yeast, nano-selenium) at an increased dose of 0.5 mg/kg feed. The study showed that the administration of different forms of selenium in the feed affected its concentration in the breast muscle and liver ($p \leq 0.01$). Nano-selenium was found to have a high bioavailability, but also a lower risk of toxicity compared to other forms of selenium. Using different forms of selenium ($p \leq 0.01$) at a dose of 0.5 mg/kg feed can significantly modify the fatty acid profile, lipid and enzymatic indices of fatty acid metabolism in breast muscle and liver.

In monogastric animals, unlike in the ruminants, unsaturated fatty acids (UFA) are not biohydrogenated from feed. For this reason, there is a correlation between delivered dietary fatty acids (FA) and those deposited in tissues of such animals as poultry^{1,2}. A high polyunsaturated FA (PUFA) concentration in the feedstuff bears the risk of increased susceptibility of tissue lipids to oxidation, which in turn may modify both taste and aroma (rancid) and the nutritive value of meat. To prevent oxidative processes, feed mixtures for poultry are supplemented with additives featuring antioxidative properties that preserve oxidative stability and, by this means, also the oxidative balance of lipids in meat³. Selenium (Se) is one of the commonly applied antioxidants. It is used in animal feeding usually in two forms: inorganic—as sodium selenite (Na_2SeO_3) or sodium selenate (Na_2SeO_4 ; SS), or organic—as selenomethionine (SeMet) or selenocysteine (SeCys). Selenium is an essential bioelement which—together with other microelements, like zinc and iodine—plays an important role in the proper functioning, development, and growth of various organisms⁴. So far, feed mixtures for broiler chickens have mainly been supplemented with inorganic forms of Se. However, with the advance of research on Se, also its other forms have been implemented, including especially these more readily absorbed in tissues compared to SS and sodium selenate⁵. The Se mitigate oxidative stress and peroxidative damage of UFA, and affect the effectiveness of fatty acid biosynthesis in animal tissues^{6,7}. Selenium deficiency in diet may adversely influence the conversion of linolenic acid (ALA) to eicosa-pentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), resulting in the unbeneficial n-6/n-3 ratio in tissue lipids. Also, Se addition to feedstuffs for livestock modifies the fatty acid profile of meat⁸⁻¹². The consumption of chicken meat increases successively each year compared to other meat types. Therefore, the enrichment of diets for poultry with appropriate forms of Se would allow producing poultry meat rich in high-quality n-3 fatty acids that are indispensable in the human diet. Recent studies have indicated that especially the long-chain n-3

¹Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland. ²Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Instytutcka 3, 05-110 Jabłonna, Poland. ³Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland. ✉email: damian_bien@sggw.edu.pl; monika_michalczyk@sggw.edu.pl

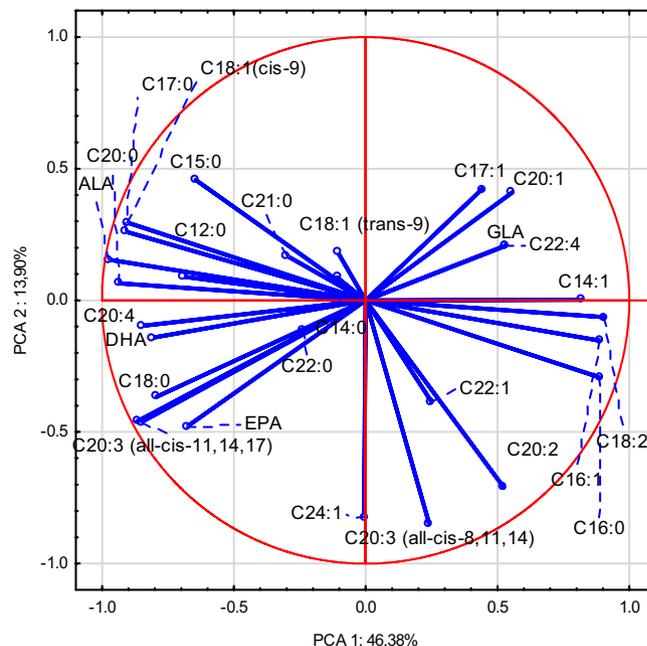


Figure 1. The distribution of the factor loadings of the variables of breast muscle samples, i.e. the correlations of fatty acids between the primary variables and the principal components. Linoleic acid (LA, C 18:2) was the most strongly and positively correlated with the first principal component.

PUFA play a vital role in preventing cardiovascular diseases^{2,13,14}. In addition, broiler diet enrichment with Se nanoparticles has been shown to be more effective because nano-Se does not have to be metabolized before being incorporated into selenoproteins and may be absorbed by the body more effectively than SS^{15,16}. Considering multiple benefits of using nanoparticles, like increased bioaccessibility and absorption^{17–19}, improving the feed conversion ratio, promoting growth and development of muscle cells, improving gut microbiota, and supporting avian coccidiosis prophylaxis^{16,20}, it seems likely that nano-Se can also increase the possibility of chicken meat enrichment with PUFA however, data in this regards are scarce.

This study aimed to compare the effects of various forms of Se on fatty acid metabolism and health status of broiler chickens.

Results

The Principal Component Analysis (PCA) was employed for the tentative exploration of data collected for the samples of breast muscles (BM) and liver. The PCA performed for the samples of BM intramuscular fat allowed distinguishing six principal components with Eigenvalues above 1.0 (Kaiser's criterion) responsible for 90.68% of the total variance. The variables contributing to this grouping (having Eigenvalues higher than 0.7) included the following fatty acids (Fig. 1): C14:1, C16:0, C16:1, and C18:2 (positive values for PCA 1) as well as C17:0, C18:0, C18:1 cis-9, C20:0, ALA, C20:3 all-cis-11,14,17, C20:4, C22:5, and DHA (negative values for PCA 1). In the case of PCA 2, significant turned out to be only the negative charges: C20:2, C20:3 all-cis-8,11,14, and C24:1. Such a point distribution alongside the PCA 1 reflects the effect of using higher doses of other Se forms (T2 and T3) than SS doses used in CON and T1 diets (0.3 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively) on the FA profile in BM intramuscular fat. The PCA performed for liver fat samples allowed distinguishing four principal components with Eigenvalues above 1.0 (Kaiser's criterion) responsible for 90.98% of the total variance. The variables contributing to this grouping of points (having Eigenvalues higher than 0.7) for PCA 1 included the following fatty acids (Fig. 2): C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, and C18:1 trans-9 (positively correlated) as well as C14:1, C16:1, C17:1, C18:1 cis-9, C18:2, C20:0, C20:2, C20:3, C22:1, C20:3, C20:4, EPA, C24:1 and DHA (negatively correlated). In the case of PCA 2 (13.90%), only C17:0, C18:3, C21:0, and C22:0 were negatively correlated. As observed for the samples of BM intramuscular fat, the distribution of points alongside PCA 1 reflects the influence of using other forms of Se than inorganic Se in the chicken diet, i.e. selenized yeast (SY) and nano-Se, and modification of fatty acid profile in BM and liver caused by diet supplementation with various forms of Se.

This study analyzed feed mixtures supplemented with various forms of Se in a dose of 0.5 mg/kg feed, which is upper limits of organic Se supplementation in the chicken feed. A comparison of the fatty acid profile of BM intramuscular fat and liver fat of birds from the particular experimental groups demonstrated that the administration of the increased doses of various Se forms significantly ($p \leq 0.01$) affected the lipid composition of the examined tissues, including concentrations of SFA, MUFA, PUFA as well as n-3 and n-6 FA (Table 1). The major FA responsible for differences in the content of PUFA was C18:2 acid (LA) in BM samples and C20:4 acid (n-6) in liver samples. The use of SY or nano-Se in chicken feeding enables significantly increasing MUFA contents and increasing PUFA contents in BM. The highest content of n-3 FA in the samples of BM intramuscular fat was

Indices	Breast muscle						Liver					
	Groups				SEM	p value	Groups				SEM	p value
	CON	T1	T2	T3			CON	T1	T2	T3		
C12:0	0.1 ^{AB}	0.25 ^B	0.05 ^A	Trace	0.03	0.008	0.03	Trace	Trace	Trace	–	–
C14:0	0.38 ^a	0.47 ^b	0.42 ^{ab}	0.43 ^{ab}	0.011	0.015	0.24 ^A	0.28 ^A	0.52 ^B	0.6 ^B	0.037	<0.001
C14:1	0.04 ^A	0.03 ^A	0.08 ^B	0.1 ^B	0.007	<0.001	trace	trace	trace	0.1	–	–
C15:0	0.1 ^A	0.09 ^A	0.07 ^B	0.07 ^B	0.003	0.001	0.08 ^A	0.09 ^A	trace	0.03 ^B	0.009	0.006
C16:0	16.36 ^A	16.6 ^A	20.86 ^B	21.49 ^B	0.516	<0.001	17.5 ^A	17.44 ^A	27.37 ^B	26.1 ^B	1.124	<0.001
C16:1	1.88 ^A	1.87 ^A	3.08 ^B	3.52 ^B	0.162	<0.001	0.52 ^A	0.67 ^A	2.76 ^{AB}	4.54 ^B	0.464	0.001
C17:0	0.19 ^A	0.2 ^A	0.12 ^B	0.12 ^B	0.009	<0.001	0.38 ^A	0.53 ^A	0.13 ^B	0.16 ^B	0.038	<0.001
C17:1	0.07 ^A	0.03 ^B	0.06 ^A	0.06 ^A	0.004	0.001	Trace	Trace	Trace	Trace	–	–
C18:0	7.23 ^A	8.48 ^B	7.00 ^A	6.70 ^A	0.168	<0.001	23.42 ^C	20.76 ^{BC}	16.55 ^{AB}	14.13 ^A	0.916	<0.001
C18:1 (trans-9)	0.04	0.02	0.03	trace	0.007	ND	0.1	0.03	0.07	0.09	0.011	ND
C18:1 (cis-9)	41.41 ^A	39.47 ^B	31.25 ^C	31.08 ^C	1.010	<0.001	19.13 ^A	24.64 ^{AB}	31.38 ^{BC}	33.228 ^C	1.481	<0.001
C18:2 n-6 LA	26.37 ^B	25.7 ^B	30.63 ^A	30.5 ^A	0.562	<0.001	0.08 ^a	0.1 ^b	trace	trace	0.005	0.016
C20:0	0.12 ^B	0.16 ^A	0.08 ^C	0.08 ^C	0.007	<0.001	20.04 ^B	20.62 ^B	13.93 ^A	13.41 ^A	0.929	0.001
C18:3 n-6	0.2	0.19	0.23	0.24	0.011	ND	0.162 ^{AB}	0.2 ^B	0.13 ^A	0.15 ^A	0.008	0.002
C20:1 n-9	3.3 ^A	2.65 ^B	3.2 ^A	3.2 ^A	0.070	<0.001	0.11 ^{ab}	0.07 ^a	0.08 ^{ab}	0.13 ^b	0.009	0.049
C18:3 n-3 ALA	0.51 ^b	0.57 ^a	0.29 ^c	0.29 ^c	0.029	<0.001	0.97	1.21	0.7	0.99	0.081	ND
C21:0	0.04	0.01	trace	trace	0.005	ND	0.47	0.58	0.31	0.69	0.063	ND
C20:2	0.27 ^B	0.26 ^B	0.33 ^A	0.3 ^{AB}	0.009	0.006	Trace	Trace	Trace	Trace	–	–
C22:0	Trace	Trace	Trace	Trace	–	–	1.05 ^B	0.92 ^B	0.36 ^A	0.34 ^A	0.074	<0.001
C20:3 (all-cis-8,11,14)	0.26	0.25	0.28	0.28	0.008	ND	0.06	0.04	0.05	0.05	0.009	ND
C22:1	0.03	trace	0.03	0.02	0.006	ND	1.1 ^C	0.71 ^B	0.44 ^A	0.35 ^{AB}	0.072	<0.001
C20:3 (all-cis-11,14,17)	1.23 ^{AB}	1.55 ^A	1.03 ^{BC}	0.79 ^C	0.072	<0.001	0.22 ^C	0.12 ^B	0.02 ^A	0.04 ^A	0.018	<0.001
C20:4 n-6	0.16 ^A	0.2 ^A	0.1 ^B	0.09 ^B	0.011	<0.001	9.44 ^B	7.795 ^B	3.47 ^A	2.83 ^A	0.703	<0.001
C20:5 n-3 EPA	0.08	0.09	0.06	0.05	0.006	ND	0.54 ^B	0.41 ^B	0.19 ^A	0.15 ^A	0.037	<0.001
C24:1	0.29	0.28	0.34	0.26	0.014	ND	0.59 ^b	0.36 ^{ab}	0.17 ^a	0.37 ^{ab}	0.049	0.017
C22:6 n-3 DHA	0.26 ^a	0.26 ^a	0.16 ^b	0.10 ^b	0.018	<0.001	3.14 ^C	1.65 ^B	0.67 ^A	0.7 ^A	0.230	<0.001
Total SFA	24.01 ^C	26.29 ^B	28.61 ^A	28.89 ^A	0.440	<0.001	18.72 ^A	18.66 ^A	30.92 ^B	31.88 ^B	1.478	<0.001
Total MUFA	46.96 ^A	44.34 ^B	38.05 ^C	38.24 ^C	0.832	<0.001	45.02 ^a	48.07 ^a	49.19 ^b	48.90 ^{ab}	0.578	0.029
Total PUFA	28.09 ^B	27.65 ^B	32.09 ^A	31.84 ^A	0.535	<0.001	37.23 ^A	33.80 ^A	20.05 ^B	19.33 ^B	1.925	<0.001
n-3 PUFA	2.06 ^B	2.47 ^B	1.54 ^A	1.23 ^A	0.113	<0.001	4.97 ^C	3.29 ^B	1.59 ^A	2.12 ^{AB}	0.330	<0.001
n-6 PUFA	27.25 ^B	26.59 ^B	31.58 ^A	31.4 ^A	0.567	<0.001	22.83 ^B	22.72 ^B	15.0 ^A	14.38 ^A	1.063	<0.001
n-6/n-3 PUFA	13.78 ^A	10.81 ^A	21.56 ^B	26.72 ^B	1.592	<0.001	5.12 ^a	7.51 ^{ab}	10.49 ^b	8.13 ^{ab}	0.671	0.031

Table 1. The effect of using increased doses of various forms of selenium on the fatty acid profile of chicken broiler breast muscle and liver. The "trace" value means ≤ 0.05 g/100 g; ND—not detected; CON—control group; T1—diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed); T2—diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed); T3—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed); ^{a,b,c}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.05$; ^{A,B,C}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$.

Indices	Breast muscle						Liver					
	Groups				SEM	p value	Groups				SEM	p value
	CON	T1	T2	T3			CON	T1	T2	T3		
Selenium (mg/kg)	0.27 ^C	0.37 ^B	0.42 ^A	0.12 ^D	0.025	<0.001	3.79 ^C	2.9 ^B	0.86 ^A	0.49 ^A	0.298	<0.001
TBA (mg malonic aldehyde)	0.55 ^B	0.54 ^B	0.47 ^A	0.30 ^{AB}	0.091	<0.001	2.08 ^a	2.71 ^b	2.36 ^{ab}	2.04 ^a	0.087	0.011
DPPH (%)	52.55 ^{BC}	51.49 ^C	55.83 ^{AB}	56.12 ^A	0.588	0.002	85.53 ^A	85.71 ^{AB}	86.42 ^{BC}	86.56 ^C	0.132	0.004
GSH (mmol-SH)	0.05 ^B	0.04 ^B	0.20 ^A	0.25 ^A	0.021	<0.001	0.85 ^{AB}	0.71 ^A	0.89 ^B	0.95 ^B	0.026	0.004

Table 2. The effect of using increased doses of various forms of selenium on selenium content in tissues and oxidative indices. CON control group, T1 diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed), T2 diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed), T3 diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed); ^{a,b}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.05$; ^{A,B,C}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$.

Indices	Breast muscle						Liver					
	Groups				SEM	p value	Groups				SEM	p value
	CON	T1	T2	T3			CON	T1	T2	T3		
Desaturase 18 index (DI, 18)	85.30 ^B	82.00 ^A	81.69 ^A	82.273 ^A	0.322	<0.001	52.07	76.96	Trace	Trace	9.212	ND
Desaturase 16 index (DI, 16)	10.22 ^A	10.19 ^A	12.85 ^B	14.05 ^B	0.390	<0.001	43.93 ^A	45.61 ^A	5.93 ^B	4.26 ^B	4.721	<0.001
Total DI	65.12 ^C	62.26 ^B	55.2 ^A	55.1 ^A	0.930	<0.001	44.48 ^A	48.64 ^A	6.15 ^B	4.18 ^B	4.876	<0.001
Elongase index (EI)	0.45 ^B	0.51 ^C	0.34 ^A	0.31 ^A	0.018	<0.001	0.20 ^a	0.05 ^{ab}	0.04 ^a	0.20 ^a	0.023	0.013
Thioesterase index (TI)	43.26 ^{AB}	35.76 ^A	50.37 ^B	50.22 ^B	1.536	<0.001	Trace	Trace	Trace	35.78	–	–
Δ5 + Δ6-desaturase index	6.03 ^{BC}	7.62 ^C	4.46 ^{AB}	3.43 ^A	0.394	<0.001	22.58 ^B	15.89 ^A	10.20 ^A	11.40 ^A	1.280	<0.001
PUFA/SFA ratio	1.15	1.05	1.12	1.11	0.017	ND	1.95 ^A	1.78 ^A	0.70 ^B	0.61 ^B	0.138	<0.001
MUFA/SFA ratio	1.95 ^C	1.69 ^B	1.33 ^A	1.32 ^A	0.056	<0.001	1.16	1.46	1.15	1.23	0.047	ND
UFA/SFA ratio	3.13 ^C	2.74 ^B	2.45 ^A	2.43 ^A	0.062	<0.001	3.11 ^A	3.25 ^A	1.85 ^B	1.83 ^B	0.154	<0.001
Saturation index (S/P)	0.31 ^C	0.36 ^B	0.4 ^A	0.41 ^A	0.009	<0.001	0.01 ^A	0.01 ^A	0.04 ^{AB}	0.07 ^B	0.007	0.001
Atherogenicity index (IA)	0.23 ^C	0.26 ^B	0.32 ^A	0.33 ^B	0.009	<0.001	0.01 ^A	0.01 ^A	0.05 ^{AB}	0.08 ^B	0.008	0.001
Thrombogenicity index (IT)	2.66 ^A	3.43 ^B	2.71 ^A	2.35 ^A	0.112	0.001	0.15 ^{ab}	0.13 ^a	0.27 ^{ab}	0.72 ^b	0.085	0.034
Desirable fatty acid (DFA)	81.86 ^C	80.33 ^B	77.15 ^A	76.78 ^A	0.462	<0.001	82.35 ^A	81.90 ^A	69.33 ^B	68.32 ^B	1.539	<0.001
HFA/hypercholesterolemic FA	16.33 ^A	17.32 ^A	21.32 ^B	21.92 ^B	0.529	<0.001	0.69 ^A	0.94 ^A	3.33 ^B	4.14 ^B	0.381	<0.001
h/H	4.60 ^C	4.22 ^B	3.29 ^A	3.19 ^A	0.129	<0.001	127.35 ^A	101.20 ^A	22.69 ^B	14.49 ^B	12.123	<0.001

Table 3. Lipid indices in the aspect of the human diet and enzymatic indices of fatty acid metabolism evaluated based on the fatty acid composition of breast muscle and liver. The “trace” value means ≤ 0.05 g/100 g; ND not detected, CON control group, T1 diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed), T2 diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed), T3 diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed); ^{a,b}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.05$; ^{A,B,C}values denoted with various letters differ significantly at $p \leq 0.01$.

Discussion

Selenium is an essential element playing an important role in many physiological processes in animal bodies. It affects the appropriate growth, fertility, and immune responses²¹. In birds, Se is indispensable for the synthesis of selenocysteine, i.e. an amino acid being a constituent of selenoproteins involved in metabolic processes, like glutathione peroxidase (GSH-Px), thioredoxin reductase, and iodothyronine deiodinase²². Dietary components used in broiler feeding, including mainly cereals, can be deficient in Se mainly due to its shortages in the soil. Therefore, Se is supplemented in the poultry production to prevent its deficiencies in broiler chicken diet^{23,24}. Broiler body demand for Se has been established at 0.15 mg/kg feed²⁵. In turn, other authors recommend increasing this dose to 0.3 and 0.75 mg/kg feed^{26,27}. Given the ever increase rate of broiler chicken growth and, consequently, their faster body metabolism, it seems advisable to examine the impact of an increased diet supplementation with Se on their body protection against reactive oxygen species. This would help providing consumers with high-quality meat rich in fine-quality fat featuring a beneficial fatty acid profile^{27,28}.

Supplementation of a diet for broilers chicken with Se affects its content in meat²⁹, whereas Se form influences also its absorption, retention, and utilization in the bird bodies³⁰. Selenium selenate is absorbed by the body via simple diffusion, whereas SY—via the active transport. This allows the birds to accumulate Se in tissues and then to use it for oxidative defense in the instance of intensified stress³¹. In the study by²⁹, the highest Se concentration in BM and liver tissues was determined in the birds fed the SY-supplemented diet. These authors also showed that organic Se was more readily absorbed by the body compared to inorganic Se. In turn, in the present study, the highest Se concentration in BM was achieved in the birds from group T2 fed a diet with an increased dose of SY, whereas the highest Se concentration in the liver was determined in the birds from group T1 (SS, 0.5 mg/kg). This result also contradicts findings reported by³². The conducted study confirms that nano-Se shows higher bioavailability and lower toxicity risk than other Se forms³³, especially SS. In view of the results of the present study, the recommendations for broiler diet supplementation with nano-Se at 0.3–0.5 mg/kg seem justified²⁶. Furthermore, nano-Se added to a broiler diet in an upper recommended amount (0.5 mg/kg) may aid the proper functioning of the gastrointestinal tract. By this means, it can affect the proper development of birds' immunity³⁴, ensuring their high welfare and top quality of the finished product.

Given the increased risk of toxicity of inorganic forms due to their easy accumulation in tissues, there is a need for research on other forms of Se, which will provide important information for modern poultry production for the sake of both chickens welfare food safety for humans. 100 g of breast muscle from chickens fed a diet with elevated levels of nano-Se in feed (0.5 mg/kg) can provide 17% of the Recommended Daily Intake (RDI of Se = 70 µg/day) for an adult human³⁵. Consumption of breast muscle from T2 chickens provides up to 60% of the RDI. In contrast, Se tends to concentrate strongly in the liver. Livers from chickens fed CON, T1, (inorganic Se) diets had a successively four, five times higher recommended RDI, while those from the T2 group had more than one time higher RDI, which may pose a risk to human health. Livers from T2 chickens could potentially provide up to 70% of the RDI of this element (per 100 g of chicken liver). Appropriate supplementation with nano-Se at an increased dose (0.5 mg/kg) can result in a final product with increased nutritional value, referred to as functional food. This confirms that meat and livers enriched with nano-Se in this manner are a valuable

and safe source of Se that can contribute to improved consumer health, while maintaining the need for this element in broiler chickens and ensuring their normal growth, health and thus welfare levels. The use of nano-Se in the diet of chickens at the maximum dose of 0.5 mg/kg is allowed by the European Union regulations³⁶, as it brings mutual benefits for both the chickens and the quality of the raw material obtained from the birds. Also, nano-Se seems effective in modulating the fatty acid profile of broiler chicken meat and giblets. These findings indicate that the supplementation of broiler diet with the nanosized form of Se at the dose as in the present study is safe as its other forms in terms of enriching meat with Se, which may be important for the consumer health. In addition, nano-Se protects the liver of broiler chickens against the detrimental effect of Cr(VI)³⁷. In their study³⁸ supplemented a broiler diet with SY in a dose of 0.5 mg/kg and found that it allowed producing meat enriched with selenium at 0.256 mg/kg and enriched with n-3 FA up to 6.71% of total FA. The comparison of results obtained for the SY-supplemented group demonstrated that it was characterized by the highest Se concentration in BM (0.42 mg/kg) and by a substantially lower content of the n-3 fatty acids (1.54% of total FA). The analysis of the present study results in terms of the human diet recommendation shows that supplementing broiler diet with a higher SS dose (0.5 mg/kg feed) allows achieving the highest Se concentration in BM, the best n-6/n-3 ratio, and the highest ALA concentration.

Broiler diet supplementation with SS resulted in lower contents of C14:0 and C:16 in BM and in the liver, compared to the other additives tested. The above findings are essential from the standpoint of human nutrition because these FA can be potential promoters of cardiovascular diseases³⁹. Broiler diet supplementation with SS (groups CON and T1) caused also a clear tendency for the increased concentration of n-3 PUFAs, compared to the other Se forms tested. This correlation can be explained by the greater protection ensured by inorganic Se and, thus, by reduced degradation of PUFAs in oxidative processes⁴⁰. The latter can be ascribed to the activity of glutathione peroxidase (GPx), i.e. a selenium-dependent enzyme the main function of which is to eliminate free radicals and, consequently, to protect FA, including especially PUFAs. Selenium is an important component of GSH-Px, whereas Se supplementation can enhance mRNA GSH-Px1 expression in the liver of chickens⁴¹. In the present study, Se used in the form of SY and nano-Se was found to significantly affect PUFA accumulation in BM, and to diminish it in the liver. This is linked to the functions of BM and liver. Breast muscle accumulates PUFA mainly in lipids whereas liver is responsible for their distribution in the body. The increased level of PUFA in a diet, especially of n-3 PUFA, can lead to lipid peroxidation and, consequently, to the impairment of liver functions^{42,43}. We evidenced that the use of other than SS forms of Se had a more beneficial effect on the proper lipid metabolism in birds.

The n-3 and n-6 FA belong to two different families and cannot be synthesized by the organisms of mammals and birds. The excess of fatty acids from one family impairs the metabolism of those from the other group; hence, it is essential to maintain the optimal n-6/n-3 ratio. The use of SS in the chickens diet in the present study was found to significantly modify the FA composition, by ensuring more beneficial n-6/n-3 ratio, which is recommended in the prevention of the ischemic heart disease⁴⁴. The disturbed n-6/n-3 ratio leads to the overproduction of proinflammatory eicosanoids, which stimulate the synthesis of cytokines and acute phase proteins, which in turn are triggers of such diseases as neoplasms, cardiovascular diseases, atherosclerosis, obesity, type 2 diabetes, or Alzheimer's disease^{45,46}. In turn, lauric (C12:0), myristic (C14:0), and palmitic (C16:0) acids strongly correlate with the risk of the incidence of atherosclerosis, obesity, or ischemic heart disease^{47,48}, whereas the degree of saturation with these acids is considered to be a parameter of food quality assessment⁴⁹. In the present study, dietary supplementation with SS significantly ($p \leq 0.01$) diminished the content of saturated fatty acids and increased ALA content in BM, which is deemed important from the human nutrition perspective.

The TBARS value (mg MDA/kg sample) indicates the status of lipid oxidation in different tissues, whereas DPPH serves to measure the capability for scavenging free radicals^{50,51}. The values of atherogenicity (AI) and thrombogenicity (IT) indices ought to be as low as possible. The lower their values are, the smaller is the probability of atherosclerosis incidence and blood clots development in humans⁵².

Unlike the AI and TI indices, the values of the hypocholesterolemic and hypercholesterolemic indices (h/H) need to be as high as possible to protect a consumer against hypercholesterolemia, which is a risk factor of the atherosclerotic syndrome⁵³. In the present study, liver samples, having high contents of lipids and minerals that elicit prooxidative effects, had higher TBARS values compared to BM. The addition of selenates (0.3 mg/kg) and nano-Se (0.5 mg/kg) to diet caused a significant ($p \leq 0.05$) decrease in the content of lipid oxidation products in liver tissues, i.e. to 2.08 and 2.04 μg MDA/g, respectively. Also⁵⁴ observed the protective effect of Se on liver tissues against changes triggered by free radicals. They showed that diet supplementation with nano-Se significantly reduced the content of lipid oxidation products, from 0.55 in group C to 0.30 mg MDA/g in the amended group.

Delta-9 desaturase catalyzes the transformation of medium-chain and long-chain SFA into individual MUFA, i.e. C16:0 and C18:0 as well as C16:1 and C18:1, respectively⁵⁵. Delta-9 desaturase activity depends on the diet and age of birds⁵⁶, but also on the form of Se implemented in the diet, as indicated in the present study. The increase in delta-9 desaturase activity in the groups fed the SS-supplemented diet caused a decrease in contents of C16:0 and C18:0 FA in favor of C16:1 and C18:1 fatty acids in BM. The organisms of both mammals and birds are incapable of synthesizing essential PUFA, like LA and ALA from acetyl-CoA, but can transform them into more unsaturated long-chain essential FA when they are provided with diet. Transformations of these acids are catalyzed by, among other things, desaturases. The $\Delta 5 + \Delta 6$ -desaturase index is used to assess birds' capability to synthesize long-chain FA from LA and ALA⁵⁷. The higher value of the $\Delta 5 + \Delta 6$ -desaturase index indicates a higher effectiveness of long-chain FA synthesis. Broiler chickens are capable of synthesizing DHA and EPA from ALA, and this synthesis is catalyzed by desaturase and elongase⁵⁸. In the present study, an increased DHA content was determined in both BM and liver of the birds fed the SS-supplemented diet. The EPA content did not differ significantly ($p \geq 0.05$) between BM samples, but significant ($p \leq 0.01$) differences were noted in its content between the liver samples. The increased contents of EPA and DHA are confirmed by a significantly

Analytical components	Starter diet
Crude protein, %	22.00
Crude fiber, %	3.00
Crude fat, %	4.7
Crude ash, %	5.6
Lysine, %	1.26
Methionine, %	0.58

Table 4. Starter diet.

Analytical components	CON	T1	T2	T3
Crude protein, %	20.46	20.74	20.78	20.89
Crude fiber, %	3.05	3.32	3.20	5.89
Crude fat, %	6.90	6.68	6.60	6.44
Crude ash, %	3.10	2.42	2.07	6.41
Lysine, %	1.38	1.42	1.41	1.39
Methionine, %	0.43	0.43	0.46	0.43

Table 5. Experimental diet. CON control group, T1 diet with upper dose of inorganic Se (0.5 mg/kg feed), T2 diet with upper dose of Se in the organic form (0.5 mg/kg feed), T3 diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (0.5 mg/kg feed).

higher activity of $\Delta 5 + \Delta 6$ -desaturase in groups CON and T, which allows concluding that Se addition in the form of SS had a significant effect on the effectiveness of long-chain FA synthesis.

Conclusion

The study showed that selenium supplementation at a dose of 0.5 mg/kg feed significantly influences selenium concentration in breast muscle and liver, modifications of fatty acid profile, oxidative indices and lipid metabolism. The application of nano-Se in the amount of 0.5 mg/kg of feed is characterized by a significantly higher content of PUFAs and protection of lipids against the action of reactive oxygen species, with its high bioavailability and low toxicity for the chicken organism. The use of increased doses of selenium in feed is a response to the increasingly rapid growth rate and orgasmic metabolism of chickens. This will help to provide consumers with a high quality product rich in good quality fats.

Methods

Animals and diets. The experiment was carried out with 300 Ross 308 chicken broilers randomly allocated to 4 experimental groups, in 5 replications, 15 birds per replication. Broilers were reared under standard conditions for 42 days. They had free access to water, and were kept under a controlled light cycle. For the first 10 days, all birds were fed the same starter diet balanced to meet their nutritional demands (Table 4). On day 11 of life, they started to receive respective diets (Table 5). Experimental groups differed in terms of selenium form implemented in the diet, i.e.:

CON—control group—diet meeting nutritional demands of Ross 308 broilers with the basic (recommended) dose of inorganic Se (SS—0.3 mg/kg feed),

T1 (SS)—diet with upper dose of inorganic Se (SS 0.5 mg/kg feed),

T2 (SY)—diet with upper dose of Se in the organic form (SY, commercial preparation) (0.5 mg/kg feed),

T3 (Nano-Se)—diet with upper dose of Se in the form of nanoparticles (commercial preparation) (0.5 mg/kg feed).

Sampling procedures. Forty chickens were chosen (10 birds from each treatment; 2 birds for each replicate) for slaughter at the age of 42 days of life that had a body weight similar to the group mean. Tissues samples were collected for biochemical and antioxidant analysis.

Selenium content. Determination of Se content in breast muscle and liver was performed according to the PB-28/LF method in an accredited laboratory (PCA Accreditation Certificate No. AB 1095 Issue No. 19 dated January 1, 2022). Preparation of samples according to PN-EN 13804 standard, followed by mineralisation (MARS 5) was implemented according to PN-EN 13805 standard. Determining Se content in tissues was performed using the ICP-MS technique (Thermo XSERIES 2 system). The results were compared to the ICP multielement standard solution (19 elements in dilute nitric acid, CERTIPUR, 115474 Merck Millipore).

Antioxidant capacity. 2-Thiobarbituric acid (TBA) in tissues was determined by the extraction method according to⁵⁹, which involved measuring the absorbance of color solution, the color of which developed as a

result of the reaction between fat oxidation products (mainly malonaldehyde) and TBA. Approximately 2 g of fat was weighed into a centrifuge tube to the nearest 0.01 g, to which 5 cm³ of 10% trichloroacetic acid was added; then the mixture was triturated for 2 min with a glass rod. Next, 5 cm³ of 0.02 molar TBA solution was added and the sample was triturated again for 2 min and centrifuged for 10 min at 4000 rpm. After centrifugation, the solution was filtered into a glass tube, and after sealing the opening with polythene sheeting, the color was developed for 24 h at room temperature. Afterwards, samples were collected for colorimetric determination. The absorbance was measured using a Hitachi U-1100 spectrophotometer at 532 nm against the reagent blank. The reagent blank was prepared by adding 5 cm³ of 10% trichloroacetic acid and 5 cm³ of 0.02 molar TBA solution to a glass tube.

Measurements for radical scavenging activity in analyzed tissues were performed by routine assay procedure⁶⁰ using a synthetic DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Folin–Ciocâlțeu reagent was used as an oxidizing reagent, and all the chemicals were purchased from SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Munich, Germany) in the highest available purity.

Glutathione (GSH) concentration was determined in tissues by means of the OXISRESEARCH BIOXYTECH GSH/GSSG—412™ test (Foster City, CA, USA). Before the analysis, the samples were frozen with the addition of M2VP (1-methyl-2-vinyl-pyridinium trifluoromethanesulfonate) at a temperature of 80 °C. The released, reduced GSH was determined in accordance with the detailed instruction provided by the kit's producer. The absorbance reading (λ412) and the measurement of reaction kinetics were performed using the microplate reader Synergy 4 (BIOTEK; Winooski, VT, USA). The results were calculated using Gen5 software (BIOTEK). GSH concentration was expressed in thiol groups (mmol-SH groups).

Fatty acid composition. Total lipids from tissues were extracted following the procedure described by Folch et al.⁶¹. The fatty acids profile was determined with the gas chromatograph with FID detector according to PN-EN ISO: 5509, PN-EN ISO: 5508 as previously by Ciemniowska-Żytkiewicz⁶². Used Restek-2330 capillary column, 105 m, 0.25 mmID, 0.2 μm df (90% biscyanopropyl/10% phenylcyanopropyl polysiloxane). Initial column temperature 100 °C for 4 min. Then incremented to 240 °C at 3 °C/min. The final temperature was kept to a minimum until the elution of the last chromatographic peak. FID detector temperature 300 °C. H₂ flow 30 ml/min in FID detector, airflow 350 ml/min in FID detector, N₂ flow (make-up) 15 ml/min in FID detector. A single-point detector calibration was used for all fatty acids determined based on the standard. During calibration, the RF (response factor) was determined for each fatty acid methyl ester. Calibration curve using certified BCR-162R reference material. The basic standard contains 37 fatty acids with the same or similar composition to the standard 'Supelco 37 Component Fame Mix', undissolved or dissolved in hexane (stored according to the manufacturer's instructions). Determining the fatty acid profile was performed in an accredited laboratory (PCA Accreditation Certificate No. AB 439 Issue No. 18 dated August 2, 2019).

Fatty acid metabolism indices. Desaturation indices were computed by referring the percentage content of the product to the percentage content of the precursor, as follows⁶³:

$$DI(18): \Delta^9 - \text{desaturase (18) index} = 100 \times \frac{C18:1}{C18:1 + C18:0}$$

$$DI(16): \Delta^9 - \text{desaturase (16) index} = 100 \times \frac{C16:1}{C16:1 + C16:0}$$

$$\text{Total DI } \Delta^9 - \text{desaturase index} = 100 \times \frac{C16:1 + C18:1}{C16:1 + C16:0 + C18:1 + C18:0}$$

The elongase index (EI) and thioesterase index (TI) were calculated as follows⁶⁴:

$$\text{Elongase index (EI)} = \frac{C18:0}{C16:0}$$

$$\text{Thioesterase index (TI)} = \frac{C16:0}{C14:0}$$

The activity of Δ⁵-desaturase + Δ⁶-desaturase was determined using the following equation⁶⁵:

$$\Delta^5 - \text{desaturase} + \Delta^6 - \text{desaturase} = 100 \times \frac{C20:2 n6 + C20:4 n6 + EPA + C22:5 n3 + DHA}{C18:2 n6(LA) + ALA + C20:2 n6 + C20:4 n6 + EPA + C22:5 n3 + DHA}$$

Estimation of health indices. The established fatty acid profile enabled calculating the n-3/n-6 ratio, PUFA/SFA ratio, monounsaturated fatty acids (MUFA)/SFA ratio, and UFA/SFA ratio. The saturation index (S/P) and the atherogenicity (AI) and thrombogenicity (TI) indices were computed as follows⁴⁷:

$$\text{Saturation index (S/P)} = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{MUFA + PUFA}$$

$$\text{Atherogenicity index (AI)} = \frac{\text{C12:0} + 4 \times \text{C14:0} + \text{C16:0}}{\text{MUFA} + \text{PUFA}}$$

$$\text{Thrombogenicity index (TI)} = \frac{\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0}}{\frac{\text{MUFA} + \text{PUFA}}{2 + 3 \times n3\text{PUFA} + \frac{n3}{n6}}}$$

The DFA, HFA, and h/H ratios were calculated as follows⁶⁶:

$$\text{DFA: desirable fatty acid} = \text{UFA} + \text{C18:0}$$

$$\text{HFA/hypercholesterolemic FA} (\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0})$$

$$\frac{h}{H} = \frac{\text{hypocholesterolemic (C18:1} + \text{PUFA)}}{\text{hypercholesterolemic ratio (C14:0} + \text{C16:0)}}$$

Ethical approval. All procedures in the present study were performed in accordance with the principles of the European Union and Polish Law on Animal Protection. No action involving pain or suffering was practiced. All applicable institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The experimental procedures carried out in this study were approved by the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Warsaw University of Life Sciences (1 September 2021). The study was carried out in compliance with the Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines.

Statistical evaluation. The Principal Component Analysis (PCA) was conducted for tentative data exploration using the STATISTICA 13.0 software. Mean values of fatty acid contents in the analyzed samples were processed using the PS IMAGO PRO 6.0 statistical package employing one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was used to determine the significance of differences between the examined groups. In turn, Student's t-test was used to compare two groups.

The above-mentioned analyses were expected to provide an explicit answer to the question whether the use of various selenium forms in a diet positively affects the modification of fatty acid profile in selected tissues of chicken broilers. At the same time, they would enable establishing the most appropriate form of selenium to be used in broiler diet in order to improve meat quality and, thereby, to enrich the human diet with fine-quality fats.

Data availability

The datasets utilized and analyzed during this investigation are available upon reasonable request from the corresponding author.

Received: 18 March 2022; Accepted: 5 August 2022

Published online: 15 August 2022

References

1. Saadoun, A. & Leclercq, B. In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: Effects of nutritional state and dietary fat. *J. Nutr.* **117**, 428–435 (1987).
2. Kouba, M. & Mourot, J. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* **93**, 13–17 (2011).
3. Surai, P. F. Natural antioxidants in poultry nutrition: New developments. In *16th European Symposium on Poultry Nutrition*. 669–676 (2007).
4. Minuye, A., Zewge, F. & Chandravanshi, B. S. Levels of selenium in selected river, well and bottled waters in Ethiopia by microwave plasma-atomic emission spectrometry. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **34**, 215–226 (2020).
5. Huang, J. Q. *et al.* The Selenium deficiency disease exudative diathesis in chicks is associated with downregulation of seven common selenoprotein genes in liver and muscle. *J. Nutr.* **141**, 1605–1610 (2011).
6. Schweizer, U. *et al.* Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem. J.* **386**, 221–226 (2005).
7. Yu, L. L. *et al.* Effects of selenium supplementation on polyunsaturated fatty acid concentrations and antioxidant status in plasma and liver of lambs fed linseed oil or sunflower oil diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **140**, 39–51 (2008).
8. Schäfer, K., Kyriakopoulos, A., Gessner, H., Grune, T. & Behne, D. Effects of selenium deficiency on fatty acid metabolism in rats fed fish oil-enriched diets. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **18**, 89–97 (2004).
9. Netto, A. S. *et al.* Effects of copper and selenium supplementation on performance and lipid metabolism in confined brangus bulls. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* **27**, 488–494 (2014).
10. Pereira, A. S. C. *et al.* Lipid and selenium sources on fatty acid composition of intramuscular fat and muscle selenium concentration of Nelore steers. *Rev. Bras. Zootec.* **41**, 2357–2363 (2012).
11. González, E. & Tejada, J. F. Effects of dietary incorporation of different antioxidant extracts and free-range rearing on fatty acid composition and lipid oxidation of Iberian pig meat. *Animal* **1**, 1060–1067 (2007).
12. Zanini, S. F. *et al.* Effect of oil sources and vitamin E levels in the diet on the composition of fatty acids in rooster thigh and chest meat. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 672–682 (2004).
13. Sadeghi, A. A., Irvani, H., Torshizi, M. K. & Chamani, M. Fatty acids profiles in meat of broiler chicks fed diet containing corn oil switched to fish oil at different weeks of age. *World Appl. Sci. J.* **18**, 159–165 (2012).
14. Jankowski, J. *et al.* Fatty acid profile, oxidative stability, and sensory properties of breast meat from turkeys fed diets with a different n-6/n-3 PUFA ratio. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 1025–1035 (2012).
15. Suzuki, K. T. & Ogra, Y. Metabolic pathway for selenium in the body: Speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Addit. Contam.* **19**, 974–983 (2002).

16. Gangadoo, S., Stanley, D., Hughes, R. J., Moore, R. J. & Chapman, J. Nanoparticles in feed: Progress and prospects in poultry research. *Trends Food Sci. Technol.* **58**, 115–126 (2016).
17. Chapman, J. & Regan, F. Nanofunctionalized superhydrophobic antifouling coatings for environmental sensor applications—advancing deployment with answers from nature. *Adv. Eng. Mater.* **14**, B175–B184 (2012).
18. Chapman, J. *et al.* Antifouling performances of macro- to micro- to nano-copper materials for the inhibition of biofouling in its early stages. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6194–6200 (2013).
19. Sullivan, T., Chapman, J. & Regan, F. Characterisation of nano-antimicrobial materials. *Nano-Antimicrob. Prog. Prospect.* **25**, 181–208. https://doi.org/10.1007/978-3-642-24428-5_6 (2012).
20. Gangadoo, S. *et al.* Selenium nanoparticles in poultry feed modify gut microbiota and increase abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 1455–1466 (2018).
21. Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I. & Velichko, O. A. Selenium in poultry nutrition: From sodium selenite to organic selenium sources. *J. Poult. Sci.* **55**, 79–93 (2018).
22. Michalczyk, M. *et al.* Selenium and the health status, production results, and product quality in poultry. *Anim. Sci. J.* **92**, e13662 (2021).
23. Surai, P. F. & Kochish, I. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: The case of selenium. *Poult. Sci.* **98**, 4231–4239 (2019).
24. Surai, P. Minerals and anti-oxidants. *Re-defining Miner. Nutr.* **20**, 147–177 (2016).
25. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition. Nutrient Requirements of Poultry* (National Academies Press, 1994). <https://doi.org/10.17226/2114>.
26. Cai, S. J. *et al.* Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. *Poult. Sci.* **91**, 2532–2539 (2012).
27. Cemin, H. S. *et al.* Broiler responses to increasing selenium supplementation using Zn-L-selenomethionine with special attention to breast myopathies. *Poult. Sci.* **97**, 1832–1840 (2018).
28. Perić, L. *et al.* Effect of selenium sources on performance and meat characteristics of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **18**, 403–409 (2009).
29. Woods, S. L. *et al.* Effect of feeding different sources of selenium on growth performance and antioxidant status of broilers. *Br. Poult. Sci.* **61**, 274–280 (2020).
30. Ganther, H. E. Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *Int. J. Toxicol.* **5**, 1–5 (1986).
31. Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L. & Dufrasne, I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* **18**, 3292–3311 (2013).
32. Chen, G., Wu, J. & Li, C. Effect of different selenium sources on production performance and biochemical parameters of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* **98**, 747–754 (2014).
33. Wang, H., Zhang, J. & Yu, H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1524–1533 (2007).
34. Konieczka, P. *et al.* Cannabis-derived cannabidiol and nanoselenium improve gut barrier function and affect bacterial enzyme activity in chickens subjected to *C. perfringens* challenge. *Vet. Res.* **51**, 1–14 (2020).
35. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA J.* **12** (2014).
36. List of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs (2004/C 50/01). (2004).
37. Luo, M. *et al.* Effect of selenium nanoparticles against abnormal fatty acid metabolism induced by hexavalent chromium in chicken's liver. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 21828–21834 (2019).
38. Kralik, Z., Kralik, G., Grčević, M., Suchý, P. & Straková, E. Effects of increased content of organic selenium in feed on the selenium content and fatty acid profile in broiler breast muscle. *Acta Vet. Brno* **81**, 31–35 (2012).
39. Praagman, J. *et al.* The association between dietary saturated fatty acids and ischemic heart disease depends on the type and source of fatty acid in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Netherlands cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **103**, 356–365 (2016).
40. Betti, M. *et al.* Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poult. Sci.* **88**, 1085–1095 (2009).
41. Yuan, D., Zhan, X. A. & Wang, Y. X. Effect of selenium sources on the expression of cellular glutathione peroxidase and cytoplasmic thioredoxin reductase in the liver and kidney of broiler breeders and their offspring. *Poult. Sci.* **91**, 936–942 (2012).
42. Konieczka, P., Rozbicka-Wieczorek, A. J., Więsyk, E., Smulikowska, S. & Czuderna, M. Improved derivatization of malondialdehyde with 2-thiobarbituric acid for evaluation of oxidative stress in selected tissues of chickens. *J. Anim. Feed Sci.* **23**, 190–197 (2014).
43. Konieczka, P. *et al.* Metabolism and nutrition: Interactive effects of dietary lipids and Vitamin E level on performance, blood eicosanoids, and response to mitogen stimulation in broiler chickens of different ages. *Poult. Sci.* **96**, 359–369 (2017).
44. Del Gobbo, L. C. *et al.* ω -3 Polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: Pooling project of 19 cohort studies. *JAMA Intern. Med.* **176**, 1155–1166 (2016).
45. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
46. Calder, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 25 (2006).
47. Ulbricht, T. L. V. & Southgate, D. A. T. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* **338**, 985–992 (1991).
48. Haug, A., Høstmark, A. T. & Harstad, O. M. Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids Health Dis.* **6**, 1–16 (2007).
49. Legrand, P. & Hermier, D. Hepatic Δ 9 desaturation and plasma VLDL level in genetically lean and fat chickens. *Int. J. Obes.* **16**, 289–294 (1992).
50. Mir, N. A. *et al.* Inclusion of flaxseed, broken rice, and distillers dried grains with solubles (DDGS) in broiler chicken ration alters the fatty acid profile, oxidative stability, and other functional properties of meat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **120**, 1700470 (2018).
51. Kumar, F. *et al.* Role of flaxseed meal feeding for different durations in the lipid deposition and meat quality in broiler chickens. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **96**, 261–271 (2019).
52. Donovan, D. C. *et al.* Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **83**, 2620–2628 (2000).
53. Rafeian-Kopaei, M., Setorki, M., Dousti, M., Baradaran, A. & Nasri, H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int. J. Prev. Med.* **5**, 927–946 (2014).
54. Dvorska, J. E., Pappas, A. C., Karadas, F., Speake, B. K. & Surai, P. F. Protective effect of modified glucmannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **145**, 582–587 (2007).
55. Reh, W. A. *et al.* Hot topic: Using a stearoyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* **87**, 3510–3514 (2004).
56. Poureslami, R., Turchini, G. M., Raes, K., Huyghebaert, G. & De Smet, S. Effect of diet, sex and age on fatty acid metabolism in broiler chickens: SFA and MUFA. *Br. J. Nutr.* **104**, 204–213 (2010).
57. Dal Bosco, A., Mugnai, C., Ruggeri, S., Mattioli, S. & Castellini, C. Fatty acid composition of meat and estimated indices of lipid metabolism in different poultry genotypes reared under organic system. *Poult. Sci.* **91**, 2039–2045 (2012).
58. Schmitz, G. & Ecker, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **47**, 147–155 (2008).

59. Shahidi, F. Flavour and oxidative rancidity in meat products. In *36th International Congress of Meat Science and Technology*. 1008–1014 (1984).
60. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
61. Folch, J., Lees, M. & Stanley Sloane, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
62. Ciemniowska-Zytkiewicz, H. *et al.* Determination of lipid and phenolic fraction in two hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chem.* **168**, 615–622 (2015).
63. Okada, T. *et al.* Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 747–750 (2005).
64. Zhang, S. *et al.* Effects of breed, sex, and halothane genotype on fatty acid composition of pork longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* **85**, 583–591 (2007).
65. Sirri, F., Castellini, C., Roncarati, A., Franchini, A. & Meluzzi, A. Effect of feeding and genotype on the lipid profile of organic chicken meat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 994–1002 (2010).
66. Pilarczyk, R., Wójcik, J., Sablik, P. & Czerniak, P. Fatty acid profile and health lipid indices in the raw milk of simmental and holstein-friesian cows from an organic farm. *South Afr. J. Anim. Sci.* **45**, 30–38 (2015).

Author contributions

D.B., M.M., P.K. conceived the project idea, designed the study and supervised the project. D.B. M.M. performed the experiments. D.B., M.M., P.K., D.S., M.K. performed the laboratory work D.B., M.M., P.K. analyzed the data and wrote the manuscript. All the listed authors have read the manuscript and agreed to all of the contents.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Grant No. 2018/29/B/NZ9/01351 “Bioactivity of cannabidiol and nano-selenium in the maintenance of gut immunological and integrity potential in chickens”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.B. or M.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide*

Damian Bien^{1,2,}, Monika Michalczuk¹, Artur Jóźwik³,
Arkadiusz Matuszewski⁴, Pawel Konieczka^{5,6}**

¹ Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences,
Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

² Division of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences,
Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

³ Institute of Genetics and Animal Biotechnology Polish Academy of Sciences,
Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland

⁴ Department of Animal Environment Biology, Institute of Animal Sciences,
Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

⁵ Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology
and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Instytutcka 3, 05-110 Jabłonna, Poland

⁶ Department of Poultry Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
10-719 Olsztyn, Poland

(Accepted March 8, 2024)

* This work was supported by the National Science Centre, Grant no. 2018/29/B/NZ9/01351 "Bioactivity of cannabidiol and nano-selenium in the maintenance of gut immunological and integrity potential in chickens"

**Corresponding author: damian_bien1@sggw.edu.pl

The present study aimed to evaluate the effect of a *Cannabis sativa* extract rich in cannabidiol in the diet of chickens under induced stress conditions. This was achieved through the administration of subclinical doses of inflammation-inducing *Clostridium perfringens* bacteria and lipopolysaccharide, which are commonly found in poultry production. A total of 204 male Ross (line 308) chicks were divided into 6 groups, with variations in *Cannabis sativa* extract addition (30 g/1000 g of feed on top) and stress induction methods. At 21 and 22 days of age the birds from the CH1 group were infected (*per os*) with 1 mL of inoculum (brain-heart infusion medium) containing approximately 10^8 CFU/mL of *C. perfringens*. At the same times birds of group CH2 were *per os* administered lipopolysaccharide in a dose of 1 mL containing 250 µg/kg body weight of. The results indicate that incorporating a 30 g/1000 g *Cannabis sativa* extract (CBD) additive in chicken diets leads to an increase in ultimate body weight and maintains weight under stressed conditions ($P < 0.05$), without adverse effects on slaughter analysis. Moreover, CBD supplementation does not significantly affect ($P > 0.05$) the physical and chemical parameters or primary composition of breast muscle and liver. However, it may alter the n-6/n-3 acid ratio. Additionally, CBD supplementation helps maintain blood biochemical and antioxidant parameters, supporting overall chicken body homeostasis stressed. Incorporating *Cannabis sativa* extracts at 30 g/1000 g of feed presents a potential protective measure to enhance poultry farming in challenging intensive production conditions.

KEYWORDS: cannabidiol / chicken / growth performance / meat quality / inflammation

Poultry production is predominantly based on intensive rearing (95%), which unfortunately reduces the birds' resistance to stress, leading to health issues and potential contamination of meat products [Dal Bosco *et al.* 2021]. To mitigate these effects, alternatives to pharmaceutical agents are being explored. One such alternative is cannabidiol (CBD), derived from hemp (*Cannabis sativa*), which has shown potential for regulating both brain and immune functions [Yekhtin *et al.* 2022, Konieczka *et al.* 2022]. While CBD's therapeutic effects have been extensively studied in human medicine, its impact on chickens remains unknown due to dosage uncertainties [Klein and Cabral 2006, Izzo and Sharkey 2010, Konieczka *et al.* 2020]. Recent studies have found a correlation between the hosts' intestinal response and meat quality in chickens, with CBD diets reducing bacterial activity in meat [Konieczka *et al.* 2022] and affecting lipid metabolism [Zhou *et al.* 2016].

Necrotizing enterocolitis (NE), caused by the anaerobic bacterium *Clostridium perfringens*, leads to economic losses in the poultry sector due to reduced bird immunity and increased morbidity and mortality. Despite numerous strategies to mitigate *C. perfringens* adverse effects, results remain inconclusive due to limited understanding of its pathogenetic mechanisms [Olkowski *et al.* 2006, Keyburn *et al.* 2010, Koutoulis *et al.* 2015, Keerqin *et al.* 2017]. Some *C. perfringens* strains produce enterotoxins, causing diarrhoea and acute abdominal cramps in humans, making it a common food poisoning agent [Brynstad and Granum 2002, Huang *et al.* 2018, Lahti *et al.* 2008, Lindström *et al.* 2011]. Thus, solutions to prevent *C. perfringens* multiplication in chickens are needed. Another issue is lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin from Gram-negative bacteria. Chickens, resistant to LPS compared to other species, may still exhibit clinical signs and sickness behaviours from *i.v.* LPS administration, negatively impacting performance [Cheng *et al.* 2004, de Boever *et al.* 2009, Warren *et al.* 2010, Liu *et al.* 2015].

The aim of the present study was to determine whether the use of *Cannabis sativa* extract rich in cannabidiol in the diet of chickens under induced stress conditions (through the *in vivo* administration of *Clostridium perfringens* bacteria and LPS at subclinical doses) improves the growth performance, slaughter analysis, chemical composition, physicochemical parameters, fatty acid profile, and oxidative status of selected tissues from slaughtered chickens.

Material and methods

Chemical composition of *Cannabis sativa* extract (CBD)

Hemp panicles (*Cannabis sativa*) obtained from plants were harvested in 2019 at the Institute of Natural Fibres & Medicinal Plants, Poznań, Poland. The plant material was collected, cut, and dried at room temperature. Hemp supercritical carbon dioxide extract was obtained from the Supercritical Extraction Plant, Institute of New Chemical Synthesis, Puławy, Poland. The parameters of the extraction were as follows: pressure, 250 bar; temperature, 60°C; and a flow rate of 40 kg CO₂/1 kg of spent hemp. After the evaporation process, the hemp extract contained 12% cannabidiol, 0.49% tetrahydrocannabinol and 0.38% tetrahydrocannabinolic acid, as determined by HPLC. (Institute of Natural Fibers and Medicinal Plants, Poznań, Poland).

Animals and diets

The experiment was carried out with 204 male Ross 308 chicken broilers randomly allocated to six experimental groups – 34 birds per group. The broilers were reared under standard conditions, and were kept on litter in pens for 35 days. They had free access to water, and were kept under a controlled light cycle [Aviagen 2019]. Chickens were fed diets similar to the standard commercial starter (days 1-7) and

Table 1. Experimental diet

Component (g/kg diet)	Starter 1-7 d.	Grower 8-35 d.	Calculated nutrient density	Starter 1-7 d.	Grower 8-35 d.
Maize	200.0	200.0	ME (kcal/kg)	2900	3000
Soybean meal	306.9	270.0	Crude protein (g/kg)	22.0	20.5
Wheat	432.0	463.0	Crude fiber (g/kg)	2.72	2.7
Lard	20.1	31.5	Crude fat (g/kg)	4.0	5.2
Ronozyme ¹	0.2	0.1	Crude ash (g/kg)	2.7	2.5
Salt	3.3	3.1	Lysine (g/kg)	1.4	1.2
Limestone	15.4	14.0	Methionine (g/kg)	0.6	0.6
Monocalcium phosphate	10.8	8.6	Met. + Cys (g/kg)	1.0	0.9
Choline chloride	1.0	1.0	Threonine (g/kg)	0.9	0.8
DL-Methionine	3.0	2.6	Calcium (g/kg)	0.9	0.9
L-Lysine	3.7	2.8	Available phosphorus (g/kg)	0.4	0.4
L-Threonine	1.1	0.8			
Vitamins + trace minerals ²	2.5	2.5			

The composition of basal diets (g/kg as-is, unless indicated otherwise) fed to broilers over a 35-day feeding period.

¹ Ronozyme WX (Novozymes, Copenhagen, Denmark); 360 FXU/kg diet. ² Provided IU per kg of feed: vitamin A, 10,000; vit. D3, 4500; mg: vit. E, 80; vit. B1, 1.5; vit. B2, 5; biotin, 0.12; vit. B6, 2.5; vit. B12, 0.02; vit. K, 33; nicotinic acid, 50; folic acid, 1.1; pantothenic acid, 14; choline, 200; betaine, 160; Mn, 120; Zn, 100; Se, 0.35; Cu, 20; Fe, 40; J, 3; and Ca, 0.6.

grower (days 8-35) diets. The same basal diet was used for each treatment, formulated to meet the nutritional requirements of Ross 308 broilers according to their age (as shown in Tab. 1).

Applied Experimental Challenges: Induced Stress Conditions

Experimental groups:

- CON (control treatment);
- CON + CBD (CON with supplementation of CBD extract in the diet (30 g/1000 g diet, on top);
- CH1: *C. perfringens* (as CON but challenged with *C. perfringens* bacteria);
- CH2: LPS (*Escherichia coli*) (as for CON but with oral gavage of *E. coli* lipopolysaccharide);
- CH1 + CBD: *C. perfringens* + CBD extract;
- CH2 + CBD: LPS (*E. coli*) + CBD extract.

The birds were briefly weighed individually after 4 h of feed deprivation. At 21 and 22 days of age the birds of group CH2 were orally administered LPS (*Escherichia coli*, serotype O55:B5; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) reconstituted in 0.9% sterile saline (0.5 mg/mL) in a dose of 1 mL containing 250 µg/kg body weight of LPS [Konieczka *et al.* 2019]. At the same times, (day 21 and 22), the birds from the CH1 group were infected (*per os*) with 1 mL of inoculum (brain-heart infusion medium) containing approximately 10⁸ CFU/mL of *C. perfringens*, type A, strain 56 bacteria according to a previously validated protocol [Konieczka *et al.* 2020]. The *C. perfringens* bacteria were obtained from infected chickens in Belgium. The strain used was analytically confirmed to be α-toxin- and NetB toxin-positive, and β-toxin- and enterotoxin-negative, as declared by the supplier (Ghent University, Merelbeke, Belgium). The birds in the CON and CON + CBD groups were each administered the same dose of sterile saline and brain-heart infusion medium with a coccidial cocktail (placebo groups) containing the following *Eimeria* species was administered to all birds at 14 and 15 days of age to create a favourable gut environment for *C. perfringens* colonization.

Sampling procedures

Sixty male chickens were chosen (10 birds from each treatment) for slaughter at the age of 35 days of life that had a body weight similar to the group mean. Tissue samples were collected for slaughter efficiency, chemical composition, physicochemical, biochemical and antioxidant analysis.

Assessment of slaughter efficiency, chemical composition, and the physicochemical properties of pectoral muscles

Upon completion of the feeding experiment, 10 birds (n=10) from each experimental group were randomly selected and weighed prior to slaughter. After slaughter and the carcasses had been cooled, the slaughter efficiency of the chickens was assessed on the basis of a previous report by Michalczuk *et al.* [2016], which determined the percentages of pectoral muscle, legs, and giblets.

The basic chemical composition was determined for the collected pectoral muscle samples: dry weight, crude fat, crude protein, and ash. The determinations were made using the NIR method [Michalczyk *et al.* 2016]. The physicochemical properties of the pectoral muscles were then analyzed (pH₂₄ was determined with a pH-meter, CP-411, Elmetron, Zabrze). To determine drip loss, the pectoral muscles were weighed; then, after 24 h, they were dried and reweighed. Drip loss was determined using the difference in masses. The water absorption coefficient was determined according to the Grau and Hamm method [1953], while the meat's color components were identified using a CR-410 colorimeter.

Type III collagen determination was performed using the Chicken Collagen Type 3 ELISA Kit from Bioassay Technology Laboratory (Cat. No. E0314Ch) according to the protocol provided by the manufacturer.

Fatty acids composition

Total lipids from tissues were extracted following the procedure described by Folch *et al.* [Folch *et al.* 1957]. The fatty acid profile was determined using a gas chromatograph with FID detector according to PN-EN ISO: 5509, PN-EN ISO: 5508, as previously determined by Ciemniowska-Zytkiewicz *et al.* [2015]. Used Restek-2330 capillary column, 105 m, 0.25 mm ID, 0.2 µm df (90% (bis)cyanopropyl /10% cyanopropyl-phenyl polysiloxane). The initial column temperature was 100°C for 4 min, which was then incrementally increased to 240°C at 3°C/min. The final temperature was kept to a minimum until the elution of the last chromatographic peak. The FID detector temperature was 300°C. H₂ flow 30 mL/min in FID detector, airflow 350 mL/min in FID detector, N₂ flow (make-up) 15 mL/min in FID detector. Single-point detector calibration was used for all the determined fatty acid based on the standard. During calibration, the RF (response factor) was determined for each fatty acid methyl ester. Calibration curve using certified BCR-162R reference material. The basic standard contained 37 fatty acids and had the same or similar composition to the standard (Supelco 37 Component Fame Mix), undissolved or dissolved in hexane (stored according to the manufacturer's instructions). The determination of the fatty acid profile was performed in an accredited laboratory (PCA Accreditation Certificate No. AB 439 Issue No. 18 dated 2 August 2019).

Blood biochemical parameters

Blood biochemical parameters were determined in a veterinary laboratory using methods: ALT (alanine aminotransferase) – modified IFCC, TRIS, no P5P; α-amylase – CNPG 3 – enzymatic; ALP (alkaline phosphatase) – PNPP with AMP as buffer; AST (aspartate aminotransferase) – modified IFCC, TRIS, no P5P; TP (total protein) – biuret method; TCh (total cholesterol) – enzymatic H₂O₂ production; CK (creatinine kinase) – NAC – activated; GLDH (glutamate dehydrogenase) – triethanolamine buffer; GGTP (gamma-GT, aminotransferase) – IFCC standard; UA (uric acid) – uricase; LDH (lactate dehydrogenase) – lactate-pyruvate; TTG (triglycerides) – enzymatic method; BA (bile acid) – diazo-(J-G) w/blank; InP (inorganic phosphorus)

– phosphomolybdate – UV; K (potassium) – ISE-diluted; Na (sodium) – SE-diluted; Fe (iron) – TPTZ [2,4,6-tri-(2-pirydylo)-5-triazyna]. Samples of blood were collected in sterile tubes without an anticoagulant. To obtain serum, the whole blood was centrifuged at 2.000 g for 10 min at 4°C and then placed in the analyzer racks.

Indicators of health status and antioxidant potential

On the day of slaughter, ten birds (n=10) from each experimental group, were randomly chosen for blood collection post-mortem in the amount of 1.5 mL per bird. Laboratory analysis aimed to also determine the activity of selected enzymes and antioxidant compounds by analyzing fragments of breast muscle and liver tissue weighing 5 g.

Measurements for radical scavenging activity in the analyzed tissues were performed by routine assay procedure [Brand-Williams *et al.* 1995] using a synthetic DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Folin-Ciocalteu reagent was used as an oxidizing reagent, and all the chemicals were purchased from SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Munich, Germany) at the highest available purity. The glutathione (GSH) concentration in the tissues was determined by means of the OXISRESEARCH BIOXYTECH GSH/GSSG-412™ test (Foster City, CA, USA). Before the analysis, the samples were frozen with the addition of M2VP (1-methyl-2-vinyl-pyridium trifluoromethanesulfonate) at a temperature of -80°C. The released, reduced GSH was determined in accordance with detailed instructions provided by the kit's producer. The absorbance reading ($\lambda 412$) and the measurement of the reaction kinetics were performed using the Synergy 4 microplate reader (BIOTEK; Winooski, VT, USA). The results were calculated using the Gen5 software (BIOTEK). GSH concentration was expressed in thiol groups (mmol-SH groups).

Ethical statement

All procedures in the present study were evaluated and approved by the Local Animal Care and Ethics Committee in Olsztyn (UWM), Poland (Resolution No. 3/2021), and were performed in accordance with the principles of EU (recommendation 2007/526/CE) and Polish Law on Animal Protection. All procedures in this study complied with the ARRIVE guidelines.

Statistical analysis

The normality of the data was checked using the Shapiro–Wilk test. The homogeneity of group variances was examined by the use of the Levene's test. Effects of CBD, and CH and CBD by CH interaction were analyzed using a two-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test for pairwise comparisons, where appropriate.

Results were considered statistically significant when associated with a probability lower than 5%. Results with a probability lower than 1% were considered highly significant. These computations were performed using the PS IMAGO PRO 9.0 for Windows.

Results and discussion

The results of the chickens rearing are shown in Table 2. No significant differences (P>0.05) were found for the main effects of CBD and CH. Only final body weight differed significantly (P<0.001) for the main effect of CBD. Chickens whose diets were enriched with the CBD supplement had a greater body weight on day 35 of 184 g

Table 2. Main effects and interactions for selected chicken rearing parameters

Parameters	CBD			CH			CBD x CH	
	NO	YES	P value	CON	CHI	CH2	SEM	P value
Body weight (g):								
day 1	44.24	44.17	0.157	44.18	44.25	44.43	0.162	0.405
day 35	1913 ^A	2097 ^B	<0.001	2051	1942	2012	31.4	0.086
FCR (kg kg ⁻¹)	1.64	1.68	0.021	1.63	1.68	1.69	0.031	0.387
Mortality (%)	1.96	0.98	0.025	1.47	2.94	2.94	0.029	0.091

SEM – standard error of the mean; CBD – cannabidiol; N – no addition of CBD to feed; Y – addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH – challenge; CON – control group; CHI – induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU *per os*; CH2 – induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. *per os*.
^{aA...}Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P≤0.05; capitals – P≤0.01.

Table 3. Main effects and interactions for selected parameters of cockerel slaughter analysis

Parameters	CBD			CH			CBD x CH	
	NO	YES	P value	CON	CHI	CH2	SEM	P value
Body weight (g)	1924 ^B	2127 ^A	<0.001	2074	1973	2030	30.6	0.076
Carcass weight (g)	1369 ^B	1484 ^A	<0.001	1446	1392	1440	25.5	0.268
Dressing percentage (%)	69.87	71.25	0.799	69.66	70.85	71.16	0.979	0.526
Breast muscles (g/100 g)	30.53	29.95	0.355	29.65	30.75	30.32	0.435	0.209
Leg muscles (g/100 g)	19.72	19.71	0.262	19.96	19.65	19.55	0.320	0.642
Liver (g/100 g)	3.09	3.06	0.080	3.23 ^a	3.15 ^{ab}	2.86 ^b	0.098	0.029
Fat (g/100 g)	0.47	0.37	0.051	0.41	0.36	0.49	0.063	0.306

SEM – standard error of the mean; CBD – cannabidiol; N – no addition of CBD to feed; Y – addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH – challenge; CON – control group; CHI – induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU *per os*; CH2 – induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. *per os*.
^{aA...}Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P≤0.05; capitals – P≤0.01.

relative to CON. There was also a significant ($P<0.001$) interaction effect for the final body weight. For the CON (NO=1916; YES=2232) and CH1 (NO=1845; YES=2100) groups whose diets were enriched with a 3.0% addition of CBD to the feed, the best results were obtained significantly ($P<0.001$) in relation to final body weight (Fig. 1a).

The slaughter analysis of cockerels ($n=10$) revealed a significant interaction effects ($P<0.001$) for the following parameters: slaughter weight, carcass weight, and proportion of liver in the carcass (Tab. 3). Carcasses obtained from the chickens (CON: NO=1333 g; YES=1560 g; CH1: NO=1329; YES=1455 g) whose diet was enriched with added CBD in the feed were significantly heavier ($P<0.001$) (Fig. 1b). The livers of the chickens that were maintained under induced stress conditions by administering LPS via the *per os* route were significantly ($P\leq 0.05$) smaller (NO=3.08; YES=2.64) in the group where the CBD supplement in feed was used (Fig. 1c).

Significant ($P\leq 0.05$) interaction effects were found for the parameters pH_{24} and lightness (L_{24}^*) (Tab. 4). The pH_{24} for the pectoral muscles that originated from cockerels maintained under induced stress conditions CH1 and that received CBD supplementation in their feed were significantly ($P\leq 0.05$) lower (Fig. 2a). Also, the

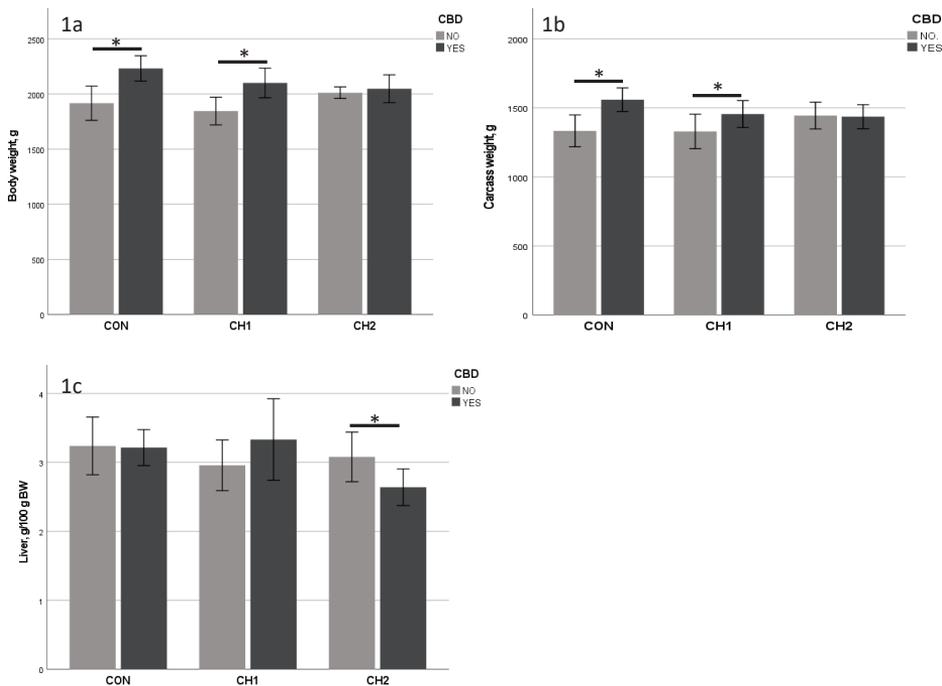


Fig. 1 (a-c). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or its absence, in tested groups of cockerels for body weight, carcass weight, and liver weight parameters; * - mean values marked with this symbol are significantly different, $P\leq 0.05$; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10^8 IU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. *per os*.

Table 4. Main effects and interactions for selected physicochemical properties in the pectoral muscle

Parameters	CBD			CH			CBD x CH P value		
	NO	YES	P value	CON	CH1	CH2		SEM	P value
pH ₂₄	5.84 ^A	5.93 ^B	0.020	5.93	5.86	5.88	0.020	0.079	0.048
Shear force (N)	41.54	38.01	1.330	41.47	38.25	39.61	1.631	0.382	0.278
L ₂₄ [*]	56.7	57.37	0.344	56.44	56.98	57.68	0.412	0.115	0.019
a ₂₄ [*]	15.17	15.19	0.252	15.54	15.00	15.05	0.311	0.369	0.682
b ₂₄ [*]	11.59	12.02	0.320	11.08	12.2	12.13	0.394	0.088	0.142
Drip loss (%)	0.52 ^a	0.47 ^b	0.017	0.46 ^a	0.53 ^b	0.50 ^{ab}	0.025	0.049	0.246

SEM – standard error of the mean; CBD - cannabidiol; N – no addition of CBD to feed; Y – addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH – challenge; CON – control group; CH1 – induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU per os; CH2 – induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. per os.
^{aA..}Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P≤0.05; capitals – P≤0.01.

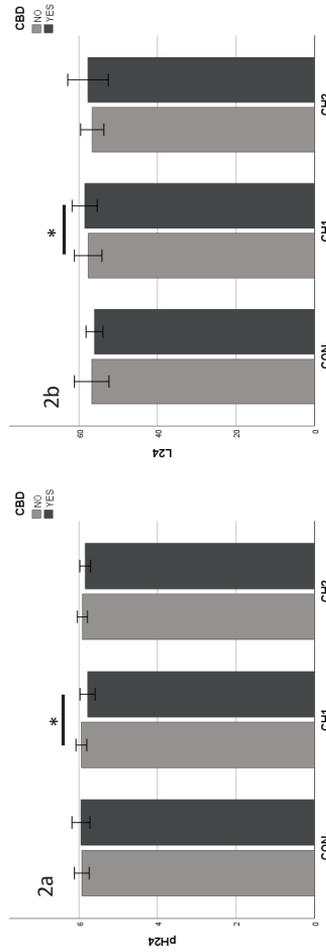


Fig. 2 (a-b). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or its absence, in tested groups of cockerels for the physico-chemical parameters of the pectoral muscle; * - mean values marked with this symbol are significantly different, P≤0.05; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ IU per os; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. per os.

pectoral muscles from the CH1 group had significantly (P≤0.01) higher lightness compared to the pectoral muscles of cockerels that were not dosed with *C. perfringens* (Fig. 2b). In addition, significant differences in drip loss were found (P≤0.05) for the main effect of CBD and CH. Breast muscles from cockerels that received the addition of 3.0% CBD in their feed had a 0.05% lower drip loss after 24 h of storage in +4°C refrigeration conditions. When incubated stress conditions were applied, drip loss increased significantly (P≤0.05) compared to CON, where this treatment was not applied (CON=0.46; CH1=0.53; CH2=0.50).

No significant ($P>0.05$) interaction effects were found for chemical components of breast muscles (Tab. 5). However, significant ($P<0.05$) main effects for CBD were found for breast muscle content: crude protein, total collagen, moisture content, and crude fat. The breast muscles obtained from cockerels fed a CBD-enriched diet were characterized by lower crude protein (-1.28%) and collagen (-0.30%), but higher fat concentration (+1.06%) compared to the breast muscle from groups not fed a CBD supplement in their feed. For the basic chemical composition of the chickens' livers,

Table 5. Main effects and interactions for selected chemical composition parameters (g/100 g) of breast muscle and liver

Item	CBD										CH		CBD x CH					
	N		Y		SEM		P value		CON		CHI		CH2		SEM		P value	
Breast muscle	crude protein	23.36 ^a	22.08 ^b	0.421	0.040	1.75	1.68	22.23	22.94	0.515	0.422	0.663	0.895					
	ash	1.68	1.77	0.060	0.319	1.75	1.68	1.75	1.75	0.080	0.735	0.895						
Liver	collagen	0.64 ^A	0.34 ^B	0.057	0.001	0.50	0.43	0.54	0.54	0.070	0.507	0.620						
	moisture	74.60 ^a	73.76 ^b	0.240	0.019	74.35	74.15	74.05	74.05	0.290	0.763	0.972						
Breast muscle	fat content	1.60 ^A	2.66 ^B	0.250	0.006	1.72	2.02	2.65	2.65	0.306	0.111	0.551						
	crude protein	19.44	19.91	0.200	0.108	19.59	19.94	19.94	19.94	0.240	0.422	0.663						
Liver	ash	1.31 ^a	1.41 ^b	0.030	0.016	1.38	1.35	1.34	1.34	0.030	0.598	<0.001						
	collagen	0.71 ^A	0.33 ^B	0.050	<0.001	0.64	0.43	0.48	0.48	0.190	0.051	0.001						
Breast muscle	moisture	76.47 ^A	75.51 ^B	0.132	<0.001	75.77 ^{AB}	75.77 ^B	76.43 ^C	76.43 ^C	0.160	0.013	<0.001						
	fat content	2.44	2.79	0.130	0.070	2.89 ^A	2.69 ^B	2.28 ^C	2.28 ^C	0.160	0.038	<0.001						

SEM – standard error of the mean; CBD – cannabidiol; N – no addition of CBD to feed; Y – addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH – challenge; CON – control group; CHI – induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU per os; CH2 – induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. per os.

^{aA...} Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – $P\leq 0.05$; capitals – $P\leq 0.01$.

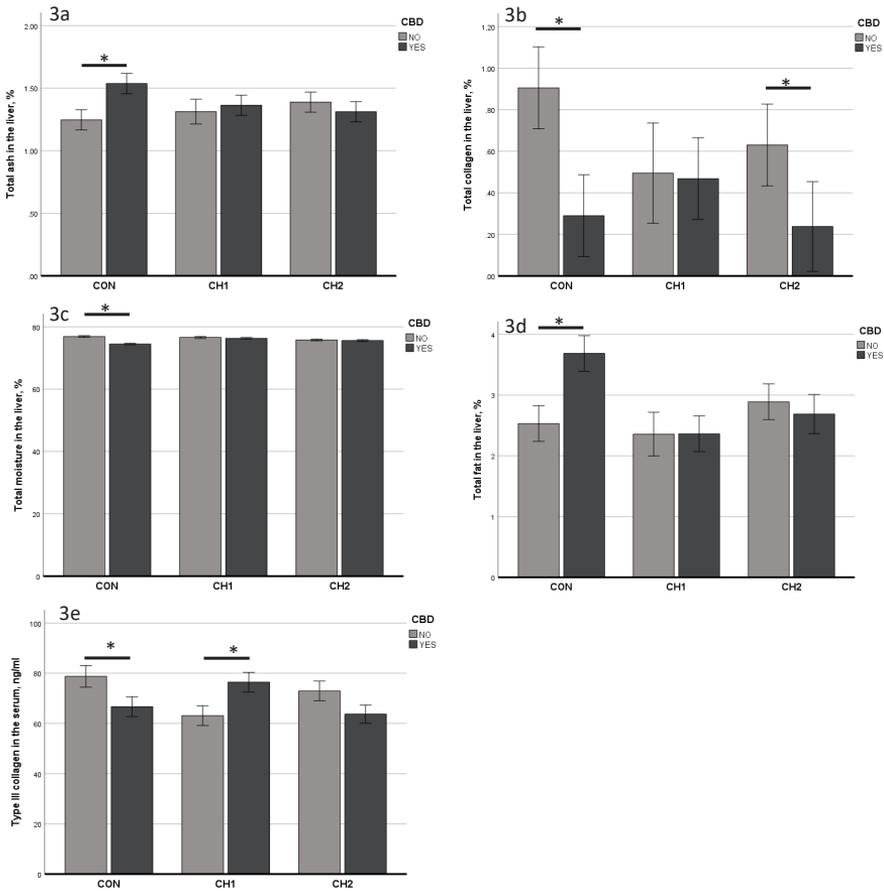


Fig. 3 (a-e). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or lack thereof, in cockerel groups tested for baseline liver chemistry; * - mean values marked with this symbol are significantly different, $P \leq 0.05$; CON - control group; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10^8 IU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. *per os*

significant ($P \leq 0.01$) interaction effects were found for crude ash, total collagen, moisture content, and crude fat content. The application of a 3.0% CBD addition to the feed increased ($P \leq 0.01$) the concentration of total ash in the livers of cockerels that were not maintained under induced stress conditions. Total ash content in the groups under induced stress conditions did not differ significantly ($P > 0.05$), regardless of whether dietary CBD was used or not (Fig. 3a). The use of CBD in the chickens' diet significantly ($P \leq 0.01$) reduced total collagen content in the liver. In the CON group, the addition of 3.0% CBD to the feed reduced collagen concentrations by 0.62%, while in chickens maintained under induced stress conditions through the administration of

LPS, the total liver collagen concentration decreased by 0.53%. No effect ($P>0.05$) on the total collagen concentration in the livers of the cockerels was found when a subclinical dose of *C. perfringens* was applied (Fig. 3b). The addition of CBD to the feed had a significant ($P\leq 0.01$) effect on liver water content (-2.40%). The application of CBD to the groups with subclinical doses, CH1 and CH2, had no significant ($P>0.05$) effect on liver water content (Fig. 3c). This was similar for liver fat content. The use of induced stress conditions had no significant effect ($P>0.05$) on liver fat content, regardless of whether a CBD supplement was used or not in the chickens' diet. Only in the CON group did the addition of 3.0% CBD to the feed have a significant ($P\leq 0.01$) effect on increasing the fat concentration in the livers of the cockerels by 1.16% relative to the group where no CBD addition to the feed was used (Fig. 3d).

The administration of subclinical doses of *C. perfringens* and LPS to chickens significantly ($P\leq 0.01$) affected the concentration of type III collagen in the pectoral muscle (Tab. 6). Maintaining chickens under induced stress conditions reduces type III collagen levels by approximately 25% relative to the CON group. No main effect of CBD ($P>0.05$) was found for the addition of CBD to the feed to alter the concentration of type III collagen in the pectoral muscle. A significant interaction effect was found ($P\leq 0.01$) only for serum type III collagen concentration. The addition of CBD decreased serum type III collagen concentration by 15%, while, for the CH1 and CH2 groups, only in the CH1 group did the addition of CBD to the feed significantly ($P\leq 0.05$) increase type III collagen content by 17.5% (Fig. 3e).

Significant interaction effects ($P\leq 0.05$) were found in the fatty acid profile for the mammary's fatty acids for C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C18:1 (cis-9), ALA, C22:0, and C20:3. Significant interaction effects ($P\leq 0.05$) were also identified for fatty acid content: PUFAs, n-3 and n-6 family acids, and the ratio of n-6 to n-3 fatty acids (Tab. 7). In analyzing essential fatty acids, it was found that the use of CBD supplementation in feed had a significant effect ($P\leq 0.05$) on reducing PUFA concentration in the pectoral muscle: a 3% reduction in cockerels exposed to induced stress by through the administration of *C. perfringens per os* (CH1) - Figure 4a. When a subclinical dose of LPS was

Table 6. Main effects and interactions for type III collagen concentration (ng/ml) in the analyzed tissues

Parameters	CBD			CH			CBD x CH		
	NO	YES	P value	CON	CH1	CH2	SEM	P value	
Breast muscles	282.84	286.08	5.773	0.694	345.51 ^A	252.31 ^B	255.56 ^B	7.061	<0.001
Liver	251.8	267.26	6.962	0.127	256.62	263.51	258.45	8.520	0.837
Serum	70.49	67.85	1.970	0.350	72.73	68.33	66.44	2.416	0.199

SEM - standard error of the mean; CBD - cannabidiol; N - no addition of CBD to feed; Y - addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH - challenge; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10^8 CFU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 μ g/kg b.w. *per os*.
^{AB}Means bearing different superscripts differ significantly at $P\leq 0.01$.

Table 7. Main effects and interactions for the fatty acid profile in pectoral muscles (g/100 g)

Parameters	CBD				CH				CBD x CH	
	NO	YES	SEM	P value	CON	CH1	CH2	SEM	P value	P value
C14:0	0.47	0.48	0.005	0.788	0.45 ^A	0.50 ^B	0.47 ^A	0.012	<0.001	0.176
C15:0	0.31 ^A	0.20 ^B	0.024	0.001	0.3	0.23	0.23	0.033	0.078	0.010
C16:0	13.71	13.53	0.101	0.188	13.96 ^A	13.65 ^{AB}	13.26 ^B	0.126	0.001	0.038
C16:1	1.9	1.97	0.076	0.435	2.13 ^A	1.86 ^{AB}	1.80 ^B	0.084	0.014	0.004
C17:0	0.16	0.16	0.014	0.075	0.16	0.16	0.16	0.018	0.992	0.014
C17:1	0.10	0.07	0.266	0.373	0.11	0.08	0.07	0.027	0.408	0.433
C18:0	5.81	5.79	0.072	0.886	5.85	5.87	5.69	0.099	0.279	0.278
C18:1 (trans-9)	0.08	0.08	0.011	0.714	0.08 ^A	0.08 ^A	0.07 ^B	0.014	<0.001	0.258
C18:1 (cis-9)	33.54	33.45	0.235	0.783	34.24 ^A	33.22 ^{BC}	33.03 ^C	0.286	0.007	0.042
C20:0	0.34	32.00	0.019	0.059	0.33	0.33	0.32	0.015	0.571	0.562
C18:3, ALA	0.84	0.86	0.011	0.320	0.84	0.85	0.86	0.011	0.474	0.310
C20:1	0.34	0.31	0.013	<0.001	0.34 ^A	0.32 ^B	0.31 ^{BC}	0.019	0.001	0.225
C20:2	0.58	0.54	0.026	0.213	0.54	0.60	0.54	0.025	0.073	0.186
C22:0	0.34	0.31	0.011	0.161	0.32 ^{AB}	0.36 ^A	0.30 ^B	0.027	0.027	0.004
C20:3	2.78	3.02	0.115	0.122	3.27 ^A	2.91 ^{AB}	2.52 ^B	0.133	0.001	0.007
C20:4, AA	0.16	0.15	0.012	0.868	0.17	0.15	0.14	0.012	0.265	0.982
C24:1	1.15	1.07	0.059	0.219	1.14	1.19	1.00	0.064	0.051	0.346
C22:6, DHA	0.18	0.20	0.012	0.133	0.18 ^{AB}	0.22 ^A	0.17 ^B	0.019	0.017	0.257
SFA	21.08	20.74	0.144	0.089	21.38 ^A	21.00 ^A	20.35 ^B	0.174	<0.001	0.633
MFA	37.03	36.89	0.256	0.699	37.98 ^A	36.76 ^B	36.14 ^{BC}	0.315	0.001	0.033
PUFA	42.52	42.74	0.268	0.561	42.27 ^A	42.04 ^A	43.58 ^B	0.328	0.003	0.020
PUFA n-3	3.87	4.08	0.128	0.246	4.39 ^A	3.40 ^{AB}	3.56 ^B	0.159	0.002	0.010
PUFA n-6	38.74	38.62	0.264	0.754	38.01 ^A	37.95 ^A	40.09 ^B	0.326	<0.001	0.007
n-6/n-3 PUFA	9.83 ^A	10.56 ^B	0.261	0.049	9.64	10.33	10.61	0.324	0.094	<0.001

SEM - standard error of the mean; CBD - cannabidiol; N - no addition of CBD to feed; Y - addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH - challenge; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. *per os*; :ALA - α-Linolenic acid; AA - arachidonic acid; DHA - docosahexaenoic acid; PUFA - polyunsaturated fat.

^{aA}...Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P≤0.05; capitals – P≤0.01.

applied (CH2), the addition of CBD to the feed significantly (P≤0.01) increased the concentration of n-3 fatty acids by 21% compared to the group of roosters exposed to LPS but without the addition of 3.0% CBD (Fig. 4b). In the CH1 group, the addition of CBD to the feed significantly (P≤0.01) reduced the content of n-6 family acids by 4% (Fig. 4c). The use of a 3.0% CBD addition to feed significantly (P≤0.01) affected the n-6/n-3 ratio (Fig. 4d). The breast muscles from cockerels that had been maintained under standard conditions (CON) and had received CBD supplementation in their feed had a 25% higher n-6/n-3 ratio than muscles from cockerels not receiving CBD supplementation in their feed. For the CH1 group, the ratio was 20% higher. Only the breast muscles from cockerels maintained under induced stress conditions (CH2) were characterized by a significantly (P≤0.01) lower n-6/n-3 ratio-by 25%-when CBD was added to the diet.

Significant interaction effects in the fatty acid profile of livers were not found (P>0.05) for C15:0, C17:1, or C18:1 (trans-9) (Tab. 8). The application of a 3.0% CBD supplement to the feed influenced (P≤0.05) a change in the concentration of essential fatty acids (EFAs) in the liver under induced stress conditions. The use of CBD supplementation in the feed influenced the reduction of LA acid by nearly 19% (P≤0.05); while under induced stress (CH2) conditions, CBD supplementation

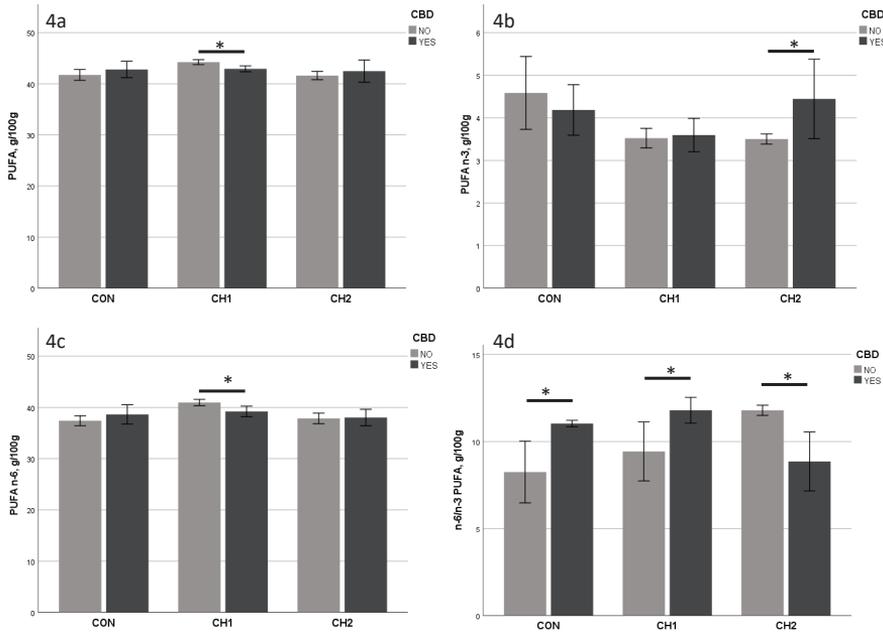


Fig. 4 (a-d). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or lack thereof, for cockerel groups tested for fatty acids profile of the pectoral muscle; * - mean values marked with this symbol are significantly different, $P \leq 0.05$; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10^8 IU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 $\mu\text{g/kg}$ b.w. *per os*.

influenced an increase in LA acid levels in the liver by nearly 7% (Fig. 5a). The presence of GLA (gamma-Linolenic acid) acid was only found in the livers of chickens maintained under induced stress conditions. The application of the CBD supplement alone under standard chick maintenance conditions did not affect ($P > 0.05$) the levels of GLA acid in the livers of cockerels (trace value means ≤ 0.050 g/100 g). The application of subclinical doses *per os* (CH1 and CH2) influenced the presence of GLA acid, but only in the CH2 group did it significantly ($P \leq 0.01$) increase the concentration of this fatty acid: almost 59% relative to the CH2 group in which no CBD was added (Fig. 5b). The addition of CBD to the feed had a significant ($P \leq 0.01$) effect in reducing (by 47%) AA levels (Fig. 5c), while in the CH1 group, it was by 25%. The same is true for the fatty acid DHA. The use of CBD in the birds' diet significantly ($P \leq 0.05$) reduced liver GLA by 41% (CON) and by 23% in the CH1 group. The use of a subclinical dose of LPS (CH2) influenced ($P \leq 0.01$) an increase in liver GLA levels (by 43%) when CBD was added to the birds' diet; this was in contrast to the CON and CH1 groups (Fig. 5d). The addition of CBD to the feed significantly ($P \leq 0.01$) decreased n-3 family acids in the CON group (by 41%) and in the CH1 group (by 24%), while in the CH2 group it increased PUFA n-3 by 27% relative to the

Table 8. Main effects and interactions for fatty acid profile in the livers (g/100 g)

Parameters	CBD				CH					CBD x CH
	NO	YES	SEM	P value	CON	CH1	CH2	SEM	P value	P value
C14:0	0.24 ^A	0.29 ^B	0.115	0.002	0.30 ^A	0.25 ^A	0.25 ^B	0.145	0.015	<0.001
C15:0	0.12 ^A	0.31 ^B	0.301	<0.001	0.13	0.26	0.25	0.037	0.051	0.081
C16:0	13.31 ^A	14.80 ^B	0.216	<0.001	15.48 ^A	13.48 ^B	13.20 ^{BC}	0.256	<0.001	<0.001
C16:1	0.55 ^A	0.78 ^B	0.051	0.002	0.96 ^A	0.58 ^B	0.47 ^{BC}	0.078	<0.001	<0.001
C17:0	0.24	0.24	0.015	0.509	0.21 ^A	0.27 ^B	0.24 ^C	0.017	<0.001	<0.001
C17:1	0.01	0.01	0.010	0.741	0.01	0.01	0.01	0.011	0.430	0.106
C18:0	18.67 ^a	17.83 ^b	0.276	0.032	18.59	17.82	18.39	0.330	0.270	0.004
C18:1 (trans-9)	0.11 ^a	0.08 ^b	0.017	0.018	0.13 ^A	0.07 ^B	0.08 ^{BC}	0.016	0.004	0.418
C18:1 (cis-9)	15.63 ^A	18.97 ^B	0.72	0.003	19.50 ^a	16.85 ^{ab}	15.55 ^b	0.894	0.013	<0.001
C18:2, LA	24.80 ^a	23.78 ^b	0.304	0.024	21.33 ^A	25.73 ^B	25.82 ^{BC}	0.389	<0.001	<0.001
C20:0	0.16 ^A	0.11 ^B	0.016	<0.001	0.18 ^A	0.13 ^B	0.10 ^B	0.015	<0.001	<0.001
C18:3, n-3 GLA	0.08 ^A	0.12 ^B	0.015	0.001	trace	0.13 ^A	0.17 ^B	0.014	<0.001	0.001
C18:3, n-6 ALA	0.22	0.18	0.029	0.060	0.18	0.20	0.23	0.026	0.181	0.121
C20:1	0.28	0.29	0.014	0.754	0.26	0.29	0.30	0.026	0.285	0.017
C20:2	1.38 ^A	1.08 ^B	0.045	<0.001	1.09 ^A	1.17 ^A	1.44 ^B	0.042	<0.001	<0.001
C22:0	0.06 ^A	0.03 ^B	0.019	<0.001	0.04	0.06	0.05	0.014	0.085	<0.001
C20:3, n-6	1.32 ^A	1.13 ^B	0.037	<0.001	1.33 ^a	1.17 ^b	1.18 ^b	0.040	0.021	0.039
C20:3, n-3	18.55 ^A	15.79 ^B	0.418	<0.001	16.36	17.24	17.92	0.501	0.108	<0.001
C20:4, AA	0.31 ^A	0.21 ^B	0.025	<0.001	0.30 ^A	0.21 ^B	0.25 ^{AB}	0.022	0.008	0.034
C24:1	2.52 ^A	2.05 ^B	0.076	<0.001	2.03 ^A	2.35 ^{AB}	2.49 ^B	0.096	0.005	<0.001
C22:6, DHA	1.07	0.99	0.057	0.312	1.00	1.03	1.07	0.069	0.765	<0.001
SFA	33.20	33.92	0.279	0.070	35.09 ^A	32.85 ^B	32.73 ^{BC}	0.337	<0.001	0.001
MFA	3.43	3.30	0.065	0.149	3.40	3.28	3.41	0.078	0.434	0.007
PUFA	47.95 ^A	43.76 ^B	0.665	<0.001	42.17 ^A	47.26 ^B	48.14 ^{BC}	0.819	<0.001	<0.001
PUFA n-3	19.76 ^A	17.01 ^B	0.437	<0.001	17.36	18.57	19.23	0.537	0.055	<0.001
PUFA n-6	27.94 ^A	26.40 ^B	0.319	0.001	24.14 ^A	28.46 ^B	28.91 ^{BC}	0.384	<0.001	<0.001
n-6/n-3 PUFA	1.50	1.60	0.056	0.413	1.41	1.63	1.55	0.065	0.062	<0.001

SEM - standard error of the mean; CBD - cannabidiol; N - no addition of CBD to feed; Y - addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH - challenge; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. *per os*; LA - linoleic acid; GLA - gamma-linolenic acid; ALA - α-linolenic; AA - arachidonic acid; DHA - docosahexaenoic acid; PUFA - polyunsaturated fat

^{AA}-Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P≤0.05; capitals – P≤0.01.

groups without CBD addition (Fig. 5e). For PUFA n-6 content, the addition of 3.0% CBD to the chicken feed was found to have a significant effect (P≤0.05) in decreasing liver PUFA n-6 concentration (by 20%) (CON) and increasing PUFA n-6 (by 6.5%) in the group where LPS-induced stress conditions were applied (Fig. 5f). The ratio of n-6 to n-3 families of acids changed with the addition of CBD to the feed. CBD was found to have significantly (P≤0.05) increased the n-6/n-3 ratio in the CON group by 20% and the CH1 group by 21%; while in the LPS-induced group the ratio decreased by 26% relative to groups maintained under the same environmental conditions but that did not have CBD added to their feed (Fig. 5g).

Blood biochemical parameters are shown in Table 9. Significant interaction effects (P≤0.05) were found for the AST and CK parameters. Maintaining chickens under induced stress conditions by administering *per os* LPS and giving chickens the CBD supplement had a significant (P≤0.05) effect, by increasing AST levels in their blood by 31%. For the CON and CH1 groups, CBD application had no significant (P>0.05) effect on blood AST levels (Fig. 6a). The addition of CBD to feed significantly reduced the level of CK in the blood of chickens in the CON group by 68% and in the CH1

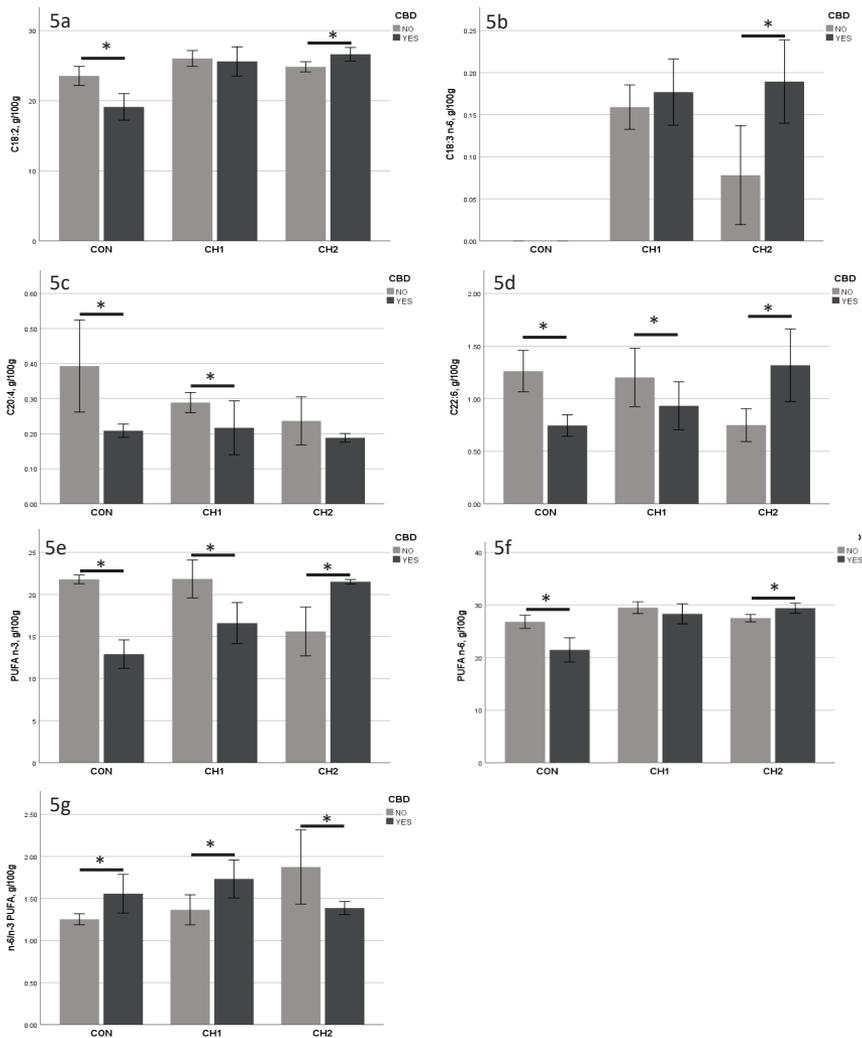


Fig. 5. (a-g). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or lack thereof, for the cockerel groups tested for liver fatty acid profile; * - mean values marked with this symbol are significantly different, $P \leq 0.05$; CON - control group; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10^8 IU per os; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 $\mu\text{g/kg}$ b.w. per os.

group by 58%, while in the CH2 group, the addition of CBD to feed had no significant effect ($P > 0.05$) on the reduction of the CK parameter (Fig. 5b). The main effect of CBD was found to be significant ($P \leq 0.05$) for an increase in the parameters TP, TCh, BA, and Na; while the addition of CBD to the feed significantly ($P \leq 0.05$) decreased the levels of CK, GLDH, InP, and K.

Table 9. Main effects and interactions for selected assays in the cockerels' blood

Parameters	CBD				CH					CBD x CH
	NO	YES	SEM	P value	CON	CH1	CH2	SEM	P value	P value
ALT (U/L)	1.88	2.08	0.184	0.457	1.85	2.00	2.09	0.229	0.744	0.724
αamylase (U/L)	590.51	637.66	30.755	0.287	580.88	586.05	675.33	37.654	0.155	0.083
ALP (U/L)	4874	3916	433.3	0.129	4654	4025	4506	530.7	0.684	0.634
AST (U/L)	396.84	407.57	25.251	0.766	353.35	414.54	438.73	30.939	0.150	0.025
TP (g/dL)	2.84 ^A	3.08 ^B	0.052	0.002	2.96	2.98	2.94	0.064	0.930	0.676
TCh (mg/dL)	109.05 ^A	132.02 ^B	3.121	<0.001	125.16 ^a	125.58 ^a	110.86 ^b	3.821	0.015	0.305
CK (U/L)	31665 ^A	17836 ^B	2385.1	<0.001	23505	21737	29010	2921.2	0.202	<0.001
GDLH (U/L)	6.12	5.84	0.489	0.678	5.66	6.20	6.08	0.592	0.794	0.339
GGTP (U/L)	23.22	24.24	1.144	0.533	23.48	21.54	26.16	1.446	0.081	0.659
UA (mg/dL)	5.79	5.28	0.365	0.322	6.45 ^A	4.02 ^B	6.13 ^A	0.441	0.001	0.731
LDH (U/L)	4382 ^a	3092 ^b	343.512	0.013	3344	3638	4229	420.7	0.331	0.925
TTG (mg/dL)	62.72	70.36	3.779	0.162	87.65 ^A	55.59 ^B	56.39 ^B	4.626	<0.001	0.030
BA (mg/dL)	19.09 ^A	24.85 ^B	1.931	0.043	22.60	18.74	24.56	2.364	0.223	0.649
InP (mg/dL)	9.61 ^A	8.73 ^B	0.150	<0.001	9.07	9.39	9.05	0.192	0.375	0.152
K (mg/dL)	38.48 ^a	35.06 ^b	1.011	0.023	36.36	35.85	38.09	1.249	0.417	0.055
Na (mg/dL)	367.21 ^a	373.43 ^b	1.796	0.020	362.80 ^A	380.42 ^B	367.74 ^A	2.197	<0.001	0.131
Ca (mg/dL)	11.42	11.46	0.134	0.847	11.47	11.48	11.36	0.164	0.829	0.225
Fe (mg/dL)	80.95	78.29	2.012	0.356	83.58 ^A	71.48 ^A	83.80 ^B	2.469	0.001	0.494

SEM - standard error of the mean; CBD - cannabidiol; N - no addition of CBD to feed; Y - addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH - challenge; CON - control group; CH1 - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU *per os*; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. *per os*; ALT (alanine aminotransferase); ALP (alkaline phosphatase); AST (aspartate aminotransferase); TP (total protein); TCh (total cholesterol); CK (creatinine kinase); GLDH (glutamate dehydrogenase); GGTP (gamma-GT, aminotransferase); UA (uric acid); LDH (lactate dehydrogenase); TTG (triglycerides); BA (bile acid); InP (inorganic phosphorus); K (potassium); Na (sodium); Fe (iron).

^{aA}-Means bearing different superscripts differ significantly at: small letters – P<0.05; capitals – P<0.01.

The oxidative status of breast and liver samples (Tab. 10) did not differ significantly (P>0.05) in the conducted study. The results obtained did not deviate from those obtained from current poultry production.

The poultry sector seeks feed additives to enhance bird health and performance. *Cannabis indica*, known as marijuana, has potential medicinal value due to its high Δ9-tetrahydrocannabinol levels [Grotenhermen *et al.* 2017, Rehman *et al.* 2021]. In contrast, *Cannabis sativa*, with its non-psychoactive properties and high CBD content, is of interest as a livestock diet ingredient. The endocannabinoid system, present in both invertebrates and vertebrates [Salzet and Stefano 2002, Oltrabella *et al.* 2017, Breivogel *et al.* 2018] is linked to CBD's action and regulates various physiological processes [Atalay *et al.* 2020, della Rocca and Di Salvo 2020]. Necrotic enteritis (NE) in chickens can potentially be addressed using *Cannabis sativa*-derived CBD in their diet. This could serve as an alternative preventive strategy, reducing antibiotic use and the risk of drug-resistant microorganisms. Chickens can be infected with *C. perfringens* without showing clinical signs, posing a risk of pathogen transfer to the food chain. The non-psychotropic component of hemp seeds, CBD, appears to have significant benefits for humans and animals [Konieczka *et al.* 2020].

In the present study, a challenge agent was used to induce stress in chickens in two ways by administering *per os* doses of subclinical Gram-positive bacteria *Clostridium perfringens* and a *per os* doses of lipopolysaccharide extracted from the cell membrane of *E. coli* bacteria. Toll-like receptor 4 (TLR-4) recognizes LPS from Gram-negative

Table 10. Main effects and interactions for antioxidant parameters in the selected tissues of the cockerels

Item	CBD				CH			CBD x CH	
	N	Y	SEM	P value	CON	CHI	CH2	SEM	P value
Breast muscle	51.38	52.10	0.387	0.568	52.21	50.81	51.94	0.515	0.250
	0.09	0.10	0.062	0.895	0.08	0.11	0.12	0.072	0.115
Liver	83.14	84.01	0.079	0.406	84.79	83.85	84.02	0.127	0.441
	0.72	0.75	0.081	0.357	0.79	0.68	0.71	0.096	0.381
									0.716

SEM – standard error of the mean; CBD – cannabidiol; N – no addition of CBD to feed; Y – addition of 30 g/1000 g CBD to feed; CH – challenge; CON – control group; CHI – induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ CFU per os; CH2 – induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. per os.

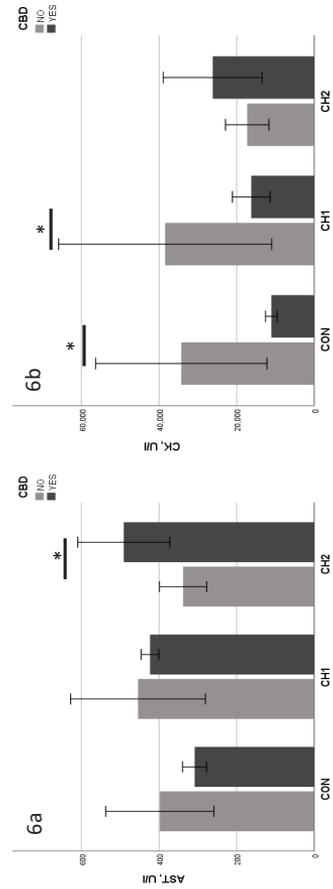


Fig. 6 (a-b). Simple effect of the addition of 30 g/1000 g CBD to feed, or lack thereof, in cockerel groups tested for AST and serum CK; * - mean values marked with this symbol are significantly different, P ≤ 0.05; CON - control group; CHI - induced stress using *C. perfringens* at a dosage of 10⁸ IU per os; CH2 - induced stress using *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 250 µg/kg b.w. per os.

bacteria and toll-receptor 5 (TLR-5) recognizes bacterial flagellin, a subunit of the bacterial flagellum; while, in addition, bacterial TLR antagonists increase the expression levels of additional pro-inflammatory cytokines such as IL-1β and IL-6 [Csernus et al. 2020], which may negatively affect normal chickens growth. NE, induced by *C. perfringens*, causes chronic damage to the intestinal mucosa, which can lead to reduced growth performance in chickens through reduced nutrient absorption due to a less efficient digestive process [Timbermont et al. 2011, Prescott et al. 2016,

Zahoor *et al.* 2018]. CBD can modulate the immune response, which may provide a first line of defense against infection [Konieczka *et al.* 2020].

In the available literature, there is little or no research on the use of CBD in the diets of chickens and its effect on various parameters, be it the effect on the meat yield or the health status of the chickens. Studies mostly focus on feeding chickens hemp seeds, which contain small amounts of CBD in their composition but also many other components such as carbohydrates, proteins (arginine, methionine, and cysteine), vitamins (e.g. γ -tocopherol), and fats extracted from the seeds, as well as essential amino acids, fiber, vitamins, and minerals (Fe, Zn, Cu, and Mn), cannabinoids, and terpenes [Yu *et al.* 2005, della Rocca and Di Salvo 2020, Rehman *et al.* 2021, Valizadehderakhshan *et al.* 2021]. To the best of our knowledge, this is one of the first studies to determine the effect of the bioactive properties of CBD in broiler chickens on rearing performance, and breast muscle and liver quality under induced stress conditions. The rearing results of the chickens in the present study confirm that the induction of stress using the *per os* route does not impair rearing performance, in contrast to studies [Chen *et al.* 2018, Gharib-Naseri *et al.* 2019] in which a subclinical dose of *Clostridium perfringens* and LPS was also used. In the current study, the chicken rearing results obtained do not deviate from those obtained from commercially reared broiler chickens. However, the administration of CBD alone, at a dose of 3.0% per kg of feed, improved final body weight, which may be related to improved feed palatability and increased feed intake. Furthermore, the use of hemp seed, which also contains CBD in its composition, but importantly also several other compounds, has been shown to increase the body weight of cockerels [Sevcikova *et al.* 2006]. There are also reports that hemp seed does not negatively affect feed conversion ratio (FCR), which may have an indirect effect on understanding the use of CBD supplementation in chicken feed [Mahmoudi *et al.* 2015]. The use of stress inducers and CBD alone did not increase chicken mortality, confirming, on the one hand, the lack of negative effects of CBD on chicken health and the correctness of the use of a subclinical dose, which, as stated, does not increase bird deaths but may only have a positive or negative effect on the rearing performance of the chickens. The slaughter analysis carried out showed that CBD application under induced stress conditions had no negative effects. Only when 3.0% CBD was administered to the CH2 groups, was a lower proportion of liver weight relative to body weight found in the CON cockerels. The knowledge of changes in liver weight in chickens exposed to LPS states that endotoxin-induced changes have already been repeatedly observed. It is known that changes in liver weight are caused by an increase in its metabolic function [Curtis *et al.* 1980, Xie *et al.* 2000, Mireles *et al.* 2005]. Analyzing similar studies in which chicken organisms were exposed to LPS and, in this case, treatment with berberine, which has properties similar to that of morphine and codeine, were also found to have a lower liver weight relative to body weight in the cockerels, in a similar way to when LPS and CBD were used in the chickens' diet [Shen *et al.* 2010]. Similarly, cannabidiol (CBD) demonstrates synergistic effects with sub-analgesic doses of morphine in an acute

pain model (i.e., acetic acid writhing) but not against thermal pain [Neelakantan *et al.* 2015]. Relative liver weight may be a good indicator of the magnitude of the acute phase response because the liver is the site where acute phase proteins are synthesized [Koj 1996]. Although this was not analyzed in this study, it can be suggested that the addition of 3.0% CBD to feed reduces the negative effects of LPS on chickens, which is undoubtedly linked to metabolic processes in the liver. Studies using other animal species have shown increased liver weight, for example, in rhesus monkeys, among others, and elevated liver enzymes, for instance, in dogs, when CBD was administered at doses as low as 2 mg/kg body weight [Rosenkrantz *et al.* 1981, Gamble *et al.* 2018].

The use of a 3.0% CBD addition to chicken feed has a lowering effect on the pH value of the pectoral muscles in cockerels that are given a subclinical dose of *C. perfringens*. Only, in this case, the results showed a slightly higher rate of post-mortem acidification of the meat. In the experiment conducted on the CH1 group, a slight increase in the L_{24} parameter of the pectoral muscle was found, which contrasts with other similar study results [Yang *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2015]. However, slight changes in the lightness of the meat or a general lack of change in the infected meat may be difficult to distinguish for the potential consumer. The addition of CBD alone (30 g/kg feed) does not alter the color parameters, which is a plus if consumers are accustomed to the product.

The analysis of the chemical components of breast and liver showed that significant interactions were only observed within the liver tissue. The results from the study show that a mild infection with *C. perfringens* [Olkowski *et al.* 2008], or induced by LPS from *E. coli*, may not affect changes in the chemical composition of the breast muscle tissue, which could be a potential risk in the supply chain. Only in liver tissue was a significantly higher concentration of ash and lower collagen, water, and fat found after CBD administration to the feed. In the CON where only the CBD addition to the feed was used, an increased proportion of fat fraction was found in the liver, which is associated with the CBD administration itself, but importantly, no change in fat content was found in the CH1 and CH2 groups. The fat levels in the livers from these groups remained the same. The present study did not analyze CBD residues in the pectoral muscle; however, based on our team's study [Konieczka *et al.* 2020], feeding the concentration of CBD in the pectoral muscle after a diet of 15 g/1000 g (CBD) for 35 days was 141.54 ± 95.54 ng/g (on a dry weight basis). The overall liver collagen concentration depended on whether CBD was used in the diet or not and on the administration of LPS to the cockerels. The addition of CBD to the feed significantly reduced the level of total collagen in the livers by several times (CON and CH2). Furthermore, the serum levels of type III collagen also decreased only after CBD was administered. The reduction in the proportion of total collagen in the liver may indicate that CBD has a therapeutic effect on liver tissue, even providing protective effects against induced LPS stress. For pectoral muscle tissue, CBD administration alone was also not found to impair the quality of the pectoral muscle, which is consistent with previous reports by our team [Konieczka *et al.* 2022].

In another study from the same research, CBD administration alone had the effect of increasing the concentration of total collagen in the pectoral muscle, which contrasts with its effect in liver tissue. Additionally, a previous study conducted by our team reported that the addition of CBD to feed did not significantly affect the collagen content of intestinal tissue, and there was no significant effect observed on total collagenase enzyme concentrations in the intestines of 35-day-old birds following *C. perfringens* provocation [Konieczka *et al.* 2020]. These findings may indirectly explain the changes observed in tissue collagen concentration.

Consumer interest in products of high health-promoting quality has led to attention being paid to their enrichment with fatty acids, including those of the n-3 family; this has mainly concerned meat and eggs. The enrichment of animal products with n-3 fatty acids is achieved mainly through the use of linseed, flaxseed oil, or oils derived from marine and oceanic products, in animal diets [Moghadasian 2008, Palmquist 2009, Yeung *et al.*, 2019]. Sources of fatty acids that are among the most important in terms of the human diet can be hemp seeds and their products, including hemp oil, which contains CBD and is found in chickens' diets, among others. Chicken meat and its most valuable component, the breast muscle, is considered one of the main sources of PUFAs in the human diet; and the fatty acid profile of such meat can be modulated by diet and the degree of fat absorption [Hulan *et al.* 1989, Poorghasemi *et al.* 2013]. In the present study (only the most significant interactions are presented), the addition of CBD to chicken feed alone significantly altered the ratio of n-6 to n-3 fatty acids. Only the LPS-induced stress and the administration of CBD to feed showed similar proportions of n-6/n-3 to the non-supplemented CBD group. Importantly, the application of LPS and CBD to feed has a significant effect on increasing n-3 acids in the breast muscle, which is positive from a dietary perspective, but may pose a risk to human health as LPS is bound to the cell wall of *E. coli*. The administration of CBD to chicken feed alone does not adversely affect the levels of PUFA, n-3 and n-6 in breast muscle. Hemp oil itself, which contains CBD, is rich in fat (25-35 g/100 g). Hemp oil contains significant amounts of linoleic acid (LA, 18:2, n-6), which accounts for more than half of the total FA. In addition, the composition includes approximately 16% α -linolenic acid (ALA, 18:3, n-3), about 12% oleic acid (OA, 18:1, n-9), approximately 6% palmitic acid (PA, 16:0), and around 3% γ -linolenic acid (GLA, 18:3, n-6), among several other fatty acids [Callaway 2004, House *et al.* 2010, Vonapartis *et al.* 2015, Kanbur 2022]. Analyzing the fatty acid profile of CBD-enriched hemp oil, it seems reasonable to change the fatty acid profile in the pectoral muscle precisely in the direction of increasing the concentration of n-6 fatty acids and thus the n-6/n-3 ratio.

It was found that feeding a diet of CBD to chickens infected with *Clostridium perfringens* reduced the levels in meat of volatile compounds that are correlated with bacterial activity [Konieczka *et al.* 2022] and that *C. perfringens* affects lipid metabolism by down-regulating the expression of the genes associated with fatty acid catabolism, including peroxisome proliferation-activated receptor alpha,

carnitine palmitoyltransferase 1, and acyl-CoA oxidase 1 [Zhou *et al.* 2016] which play important roles in lipid metabolism and thus strongly contribute to meat sensory attributes. Analyzing the key fatty acids that pertain to the human diet (i.e., LA, ALA, DHA, and PUFA), which were the focus of this study (only the most important interactions are presented), it was discovered that the inclusion of 3.0% CBD in feed markedly decreased the levels of C18:2, C20:4, C22:6, n-3, and n-6 acids. Interestingly, the presence of the C18:3 n-6 acid was detected under induced stress conditions. For the CON group, the addition of CBD to the feed had no impact on the levels of this acid in the liver tissue; while the amount of this fatty acid was found to be below the detection threshold (0.050 g/100 g). Delta6-desaturase facilitates the formation of GLA, which is the first product in the conversion of linoleic acid into dihomo- γ -linolenic acid (DGLA) and arachidonic acid (AA). DGLA serves as a direct precursor to prostaglandin series 1 (PGE1) as well as thromboxane and leukotriene series 3 (TBX3 and LT3, respectively) whereas AA serves as a direct precursor to prostaglandin series 2 (PGE2), thromboxane, and leukotriene series 4 (TBX4 and LT4, respectively). Prostaglandin E1 binds to surface receptors in smooth muscle, which results in an increase in intracellular cAMP (cyclic adenosine monophosphate) levels. Conversion to PGE1 provides γ -linolenic acid with anti-inflammatory and antiproliferative effects, as well as a possible lipid-lowering capacity [Hornych *et al.* 2002]. Delta 6-desaturase, an enzyme found in humans and birds in small quantities [Lands *et al.* 1990], is most prominently expressed in the liver, brain (specifically in neurons and astrocytes), lung parenchymal cells, cardiomyocytes, and retinal cells of humans. The body's pathological states may also modify Δ 6-desaturase activity. Infections may elucidate the presence of these fatty acids in the livers of cockerels when exposed to induced stress, in quantities exceeding the detection threshold of the fatty acid profile assay used [Fan and Chapkin 1998].

When broiler chickens are infected, various biochemical changes may occur in their bodies, including increased activity by enzymes like AST. AST is found in liver cells, muscles, hearts, and other tissues, and increased activity can arise from cellular damage or oxidative stress linked to the infection. Several studies have revealed that LPS can provoke an inflammatory response in broilers [Zhang *et al.* 2020]. Plasma AST and ALT activities are commonly used in clinical settings as specific markers of liver damage [Senior 2012]. Our findings suggest that administering CBD alone to the diet of cockerels does not significantly impact changes in serum AST levels. However, when LPS is orally administered to induce stress, and CBD is used in the diet, an increase in AST activity is observed. This is attributed to the body's response to the lipopolysaccharide of the bacterium *E. coli*. Keratin kinase (CK) is an enzyme present in muscle and other tissues that facilitates the conversion of creatine and phosphocreatine, which are essential for energy storage and transport in muscle cells. Elevated serum CK activity is indicative of muscle damage, with levels being influenced by a range of factors, such as injury, disease, or stress. Concerning broiler chicken rearing, the muscular health of chickens can be negatively affected by stress

related to rearing conditions, infections, or other stressors. Elevated CK activity may suggest muscle stress. Creatine kinase (CK) is a fundamental enzyme in cellular bioenergetics, and supports cellular and ATP homeostasis. Augmented CK levels are linked to speedy creatine phosphate (CP) clattering, glycolysis, accelerated pH diminution, and elevated water loss [Zelechowska *et al.* 2012]. Our research suggests that incorporating CBD into the diets of chickens leads to a decrease in serum CK levels and provides protection against *C. perfringens*, as evidenced by the reduced CK levels in CH1 cockerels. No muscle defects were detected upon dissection of the carcasses, nor were there any changes in the chemical composition of the breast muscle, which may suggest that the intensive production system and the fast-growing genetic material of Ross 308 lines influences CK activity and the potential therapeutic effects of CBD in reducing serum CK levels.

Analyzing the results we obtained regarding the improvement of the antioxidant capacity of CBD, we did not find that the addition of CBD to feed increased the activity enough to inhibit free radicals. Nevertheless, it is worth noting that in the case of the CH1 and CH2 groups, where the chickens' organisms were exposed to subclinical doses of *C. perfringens* and LPS, no significant differences were found either; which allows us to conclude that the addition of CBD to the feed under induced stress conditions, nevertheless, resulted in the maintenance of the oxidative potential at the CON group level. The mechanisms behind this may be attributed to the better radical suppression capacity of hemp oil containing PUFAs, 9 γ -tocopherols, or CBD [Vispute *et al.* 2021].

Conclusions

The use of a 3.0% *Cannabis sativa* extract supplement in chickens' diets increases the final body weight of chickens and maintains a high final body weight when birds are exposed to stress-induced conditions, while maintaining good results for slaughter analysis. The use of the investigated extract in the chickens' diet does not adversely affect the physicochemical parameters and basic chemical composition of the breast muscle and liver, maintaining their characteristic features. Although the use of CBD in chickens' diets may increase the n-6/n-3 acid ratio, this difference is not so large that, from the human diet's perspective, the addition of CBD negatively impacts human health. In addition, the use of a 3.0% *Cannabis sativa* extract supplement in chicken nutrition allows for the maintenance of blood biochemical and antioxidant parameters under stress-induced conditions, which contributes to maintaining the homeostasis of the chicken body. The 30 g/1000 g *Cannabis sativa* extract can provide a protective element to improve rearing under demanding conditions of intensive animal production.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The manuscript is a part of the PhD thesis of Damian Bień.

REFERENCES

1. ATALAY S., JAROCKA-KARPOWICZ I., SKRZYDLEWSKA E., 2020 - Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants* 9, 21.
2. AVIAGEN. 2019 - Ross 308: Broiler Performance Objectives. Aviagen Inc., Huntsville, AL. 1-15.
3. BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E., BERSET C., 1995 - Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 1, 25-30.
4. BREIVOGEL C.S., MCPARTLAND J.M., PAREKH B., 2018 - Investigation of non-CB1, non-CB2 WIN55212-2-sensitive G-protein-coupled receptors in the brains of mammals, birds, and amphibians. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 38, 4, 316-326.
5. BRYNESTAD S., GRANUM P.E., 2002 - Clostridium perfringens and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74, 3, 195-202.
6. CALLAWAY J.C., 2004 - Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140, 1-2, 65-72.
7. CHEN Y., ZHANG H., CHENG Y., LI Y., WEN C., ZHOU Y., 2018 - Dietary l-threonine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and intestinal barrier damage of broiler chickens at an early age. *British Journal of Nutrition* 119, 11, 1254-1262.
8. CHENG H.W., FREIRE R., PAJOR E.A., 2004 - Endotoxin stress responses in chickens from different genetic lines. I. Sickness, behavioral, and physical responses. *Poultry Science* 83, 5, 707-715.
9. CIEMNIEWSKA-ZYTKIEWICZ H., VERARDO V., PASINI F., BRYŚ J., KOCZOŃ P., CABONI M.F., 2015 - Determination of lipid and phenolic fraction in two hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chemistry* 168, 615-622.
10. CSERNUS B., BIRÓ S., BABINSZKY L., KOMLÓSI I., JÁVOR A., STÜNDL L., CZEGLÉDI L., 2020 - Effect of carotenoids, oligosaccharides and anthocyanins on growth performance, immunological parameters and intestinal morphology in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Animals* 10, 2, 347.
11. CURTIS M.J., JENKINS H.G., BUTLER E.J., 1980 - The effect of *Escherichia coli* endotoxins and adrenocortical hormones on plasma enzyme activities in the domestic fowl. *Research in Veterinary Science* 28, 1, 44-50.
12. DAL BOSCO A., MATTIOLI S., CARTONI MANCINELLI A., COTOZZOLO E., CASTELLINI C., 2021 - Extensive rearing systems in poultry production: The right chicken for the right farming system. A review of twenty years of scientific research in Perugia University, Italy. *Animals* 11, 1281.
13. DE BOEVER S., CROUBELS S., MEYER E., SYS S., BEYAERT R., DUCATELLE, R., DE BACKER P., 2009 - Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. *Avian Pathology* 38, 5, 403-411.
14. DELLA ROCCA G., AND DI SALVO A., 2020 - Hemp in Veterinary Medicine: From Feed to Drug. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 558206.
15. FAN Y.Y., CHAPKIN R.S., 1998 - Importance of dietary γ -linolenic acid in human health and nutrition. *Journal of Nutrition* 128, 1411-1414.
16. FOLCH J., LEES M., STANLEY SLOANE G.H., 1957 - A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 1, 497-509.
17. GAMBLE L.J., BOESCH J.M., FRYE C.W., SCHWARK W.S., MANN S., WOLFE L., WAKSHLAG J.J., 2018 - Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Frontiers in Veterinary Science* 5.

18. GHARIB-NASERI K., KHERAVI S. K., KEERQIN C., MORGAN N., SWICK R. A., CHOCT M., WU S.B., 2019 - Two different *Clostridium perfringens* strains produce different levels of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science* 98, 12, 6422–6432.
19. GRAU R., HAMM R., 1953 - Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Muskel. *Die Naturwissenschaften* 40, 1, 29-30.
20. GROTENHERMEN F., RUSSO E., ZUARDIA W., 2017 - Even High Doses of Oral Cannabidiol Do Not Cause THC-Like Effects in Humans. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2, 1, 1-4.
21. HORNYCH A., ORAVEC S., GIRAULT F., FORETTE B., HORROBIN D. F. 2002 - The effect of gamma-linolenic acid on plasma and membrane lipids and renal prostaglandin synthesis in older subjects. *Bratislavské Lekárske Listy* 103, 3, 101–107.
22. HOUSE J.D., NEUFELD J., LESON G., 2010 - Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 22, 11801-11807.
23. HUANG L., LI C., HWANG C.A., 2018 - Growth/no growth boundary of *Clostridium perfringens* from spores in cooked meat: A logistic analysis. *International Journal of Food Microbiology* 266, 257-266.
24. HULAN H.W., ACKMAN R.G., RATNAYAKE W.M., PROUDFOOT F.G., 1989 - Omega-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poultry Science* 68, 1, 153-162.
25. IZZO A.A., SHARKEY K.A., 2010 - Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacology and Therapeutics* 126, 1, 21-38.
26. KANBUR G., 2022 - Growth-depressing effect of dietary hempseed oil on broiler performance in the starting period and alterations in meat oxidation, serum parameters and abdominal fatty acids*. *Animal Science Papers and Reports* 40, 2, 203-216.
27. KEERQIN C., MORGAN N. K., WU S. B., SWICK R. A., CHOCT M., 2017 - Dietary inclusion of arabinoxylo-oligosaccharides in response to broilers challenged with subclinical necrotic enteritis. *British Poultry Science* 58, 4, 418-424.
28. KEYBURN A.L., BANNAM T.L., MOORE R.J., ROOD J.I., 2010 - NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium Perfringens*. *Toxins* 2, 7, 1913-1927.
29. KLEIN T.W., CABRAL G.A. 2006 - Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 1, 50-64.
30. KOJA. 1996 - Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1317, 84-94.
31. KONIECZKA P., BARSZCZ M., KOWALCZYK P., SZLIS M., JANKOWSKI J., 2019 - The potential of acetylsalicylic acid and vitamin e in modulating inflammatory cascades in chickens under lipopolysaccharide-induced inflammation. *Veterinary Research* 50, 1, 65.
32. KONIECZKA P., SZKOPEK D., KINSNER M., FOTSCHKI B., JUŚKIEWICZ J., BANACH J., 2020 - Cannabis-derived cannabidiol and nanoselenium improve gut barrier function and affect bacterial enzyme activity in chickens subjected to *C. perfringens* challenge. *Veterinary Research* 51, 1, 1-14.
33. KONIECZKA P., SZKOPEK D., KINSNER M., KOWALCZYK P., MICHALCZUK M., BIEŃ D., BOGUĆKA J., 2022 - Cannabidiol and Nano-Selenium Increase Microvascularization and Reduce Degenerative Changes in Superficial Breast Muscle in *C. perfringens*-Infected Chickens. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 237.
34. KONIECZKA P., WOJTASIK-KALINOWSKA I., POLTORAK A., KINSNER M., SZKOPEK D., FOTSCHKI B., MICHALCZUK M., 2022 - Cannabidiol affects breast meat volatile compounds in chickens subjected to different infection models. *Scientific Reports* 12, 1, 1-13.

35. KOUTOULIS K.C., PAPPAS I., FILIOUSSIS G., ATHANASIOU L.V., 2015 - Pharmacokinetics and clinical assessment of amoxicillin for the control of necrotic enteritis in broiler-breeders under field conditions. *Avian Biology Research* 8, 2, 89-96.
36. LAHTI P., HEIKINHEIMO A., JOHANSSON T., KORKEALA H., 2008 - Clostridium perfringens type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1, 371-373.
37. LANDS W.E.M., MORRIS A., LIBELT B., 1990 - Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rat tissues. *Lipids* 25, 9, 505-516.
38. LINDSTRÖM M., HEIKINHEIMO A., LAHTI P., KORKEALA H., 2011 - Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning. *Food Microbiology* 28, 192-198.
39. LIU L., QIN D., WANG X., FENG Y., YANG X., YAO J., 2015 - Effect of immune stress on growth performance and energy metabolism in broiler chickens. *Food and Agricultural Immunology* 26, 2, 194-203.
40. MAHMOUDI M., FARHOOMAND P., NOURMOHAMMADI R., 2015 - Effects of different levels of hemp seed (Cannabis sativa L.) and dextran oligosaccharide on growth performance and antibody titer response of broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science* 14, 1, 114-119.
41. MICHALCZUK M., JÓŻWIK A., DAMAZIAK K., ZDANOWSKA-SASIADEK Z., MARZEC A., GOZDOWSKI D., STRZAŁKOWSKA N., 2016 - Age-related changes in the growth performance, meat quality, and oxidative processes in breast muscles of three chicken genotypes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 40, 4, 389-398.
42. MIRELES A.J., KIM S.M., KLASING K.C., 2005 - An acute inflammatory response alters bone homeostasis, body composition, and the humoral immune response of broiler chickens. *Poultry Science* 84, 4, 553-560.
43. MOGHADASIAN M. H. 2008 - Advances in dietary enrichment with N-3 fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 5, 402-410.
44. NEELAKANTAN H., TALLARIDA R.J., REICHENBACH Z.W., TUMA R.F., WARD S.J., WALKER E.A., 2015 - Distinct interactions of cannabidiol and morphine in three nociceptive behavioral models in mice. *Behavioural Pharmacology* 26, 3, 304-314.
45. OLKOWSKI A. A., WOJNAROWICZ C., CHIRINO-TREJO M., LAARVELD B., SAWICKI G. 2008 - Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: Novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Research in Veterinary Science* 85, 3, 543-553.
46. OLKOWSKI ANDREW A., WOJNAROWICZ C., CHIRINO-TREJO M., DREW M.D., 2006 - Responses of broiler chickens orally challenged with Clostridium perfringens isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science* 81, 1, 99-108.
47. OLTRABELLA F., MELGOZA A., NGUYEN B., GUO, S., 2017 - Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. *Development Growth and Differentiation* 59, 194-210.
48. PALMQUIST D.L., 2009 - Omega-3 Fatty Acids in Metabolism, Health, and Nutrition and for Modified Animal Product Foods. *Professional Animal Scientist* 25, 3, 207-249.
49. POORGHASEMI M., SEIDAVI A., QOTBI A., LAUDADIO V., TUFARELLI V., 2013 - Influence of dietary fat source on growth performance responses and carcass traits of broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26, 5, 705-710.
50. PRESCOTT J.F., SMYTH J.A., SHOJADOOST B., VINCE A., 2016 - Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: a review. *Avian Pathology* 45, 317-322.
51. REHMAN M., FAHAD S., DU G., CHENG X., YANG Y., TANG K., DENG G., 2021a - Evaluation of hemp (Cannabis sativa L.) as an industrial crop: a review. *Environmental Science and Pollution Research International* 28, 38, 52832-52843.

52. ROSENKRANTZ H., FLEISCHMAN R. W., GRANT R.J., 1981 - Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology* 58, 1, 118-131.
53. SALZET M., STEFANO G.B., 2002 - The endocannabinoid system in invertebrates. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66, 2-3, 353-361.
54. SENIOR J.R., 2012 - Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 92, 3, 332-339.
55. SEVCIKOVA S., SKŘIVAN M., DLOUHÁ G., KOUCKÝ M., 2006 - The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science* 51, 10, 449-457.
56. SHEN Y.B., PIAO X.S., KIM S.W., WANG L., LIU P., 2010 - The effects of berberine on the magnitude of the acute inflammatory response induced by escherichia coli lipopolysaccharide in broiler chickens. *Poultry Science* 89, 1, 13-19.
57. TIMBERMONT L., HAESBROUCK F., DUCATELLE R., VAN IMMERSEEL F., 2011 - Necrotic enteritis in broilers: An updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology* 40, 341-347.
58. VALIZADEHDERAKHSHAN M., SHAHBAZI A., KAZEM-ROSTAMI M., TODD M.S., BHOWMIK A., WANG L., 2021 - Extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L. (hemp)-review. *Agriculture (Switzerland)* 11, 5.
59. VISPUTE M.M., SHARMA D., BISWAS A.K., ROKADE J.J., CHAPLE A.R., BISWAS A., KAPGATE M.G., 2021 - Dietary Hemp (Cannabis sativa L.) and Dill Seed (Anethum graveolens) Improve Physicochemical Properties, Oxidative Stability, and Sensory Attributes of Broiler Meat. *ACS Food Science and Technology* 1, 3, 453-461.
60. VONAPARTIS E., AUBIN M. P., SEGUIN P., MUSTAFA A.F., CHARRON J.B., 2015 - Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis* 39, 8-12.
61. WARREN H.S., FITTING C., HOFF E., ADIB-CONQUY M., BEASLEY-TOPLIFFE L., TESINI B., CAVAILLON J.M., 2010 - Resilience to bacterial infection: Difference between species could Be due to proteins in serum. *Journal of Infectious Diseases* 201, 2, 223-232.
62. XIE H., RATH N. C., HUFF G. R., HUFF W. E., BALOG J. M. 2000 - Effects of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Science* 79, 1, 33-40.
63. YANG X., ZHANG B., GUO Y., JIAO P., LONG F., 2010 - Effects of dietary lipids and Clostridium butyricum on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 89, 2, 254-260.
64. YEKHTIN Z., KHUJA I., MEIRI D., OR R., ALMOGI-HAZAN O., 2022 - Differential Effects of D9 Tetrahydrocannabinol (THC)- and Cannabidiol (CBD)-Based Cannabinoid Treatments on Macrophage Immune Function In Vitro and on Gastrointestinal Inflammation in a Murine Model. *Biomedicines* 10, 8, 1793.
65. YEUNG A.W.K., AGGARWAL B.B., BARRECA D., BATTINO M., BELWAL T., HORBAŃCZUK O.K., ATANASOV A.G., 2019 - Dietary natural products and their potential to influence health and disease including animal model studies. *Animal Science Papers and Reports* 36, 4, 345-358.
66. YU L.L., ZHOU K.K., PARRY J., 2005 - Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry* 91, 4, 723-729.
67. ZAHOOR I., GHAYAS A., BASHEER A., 2018 - Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. *Molecular Biology Reports* 45, 31-37.
68. ZELECHOWSKA E., PRZYBYLSKI W., JAWORSKA D., SANTÉ-LHOUTELLIER V., 2012 - Technological and sensory pork quality in relation to muscle and drip loss protein profiles. *European Food Research and Technology* 234, 5, 883-894.

69. ZHANG H., CHEN Y., CHEN Y., LI Y., JIA P., JI S., WANG T., 2020 - Dietary pterostilbene supplementation attenuates intestinal damage and immunological stress of broiler chickens challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 98, 1, 1-9.
70. ZHOU M., ZENG D., NI X., TU T., YIN Z., PAN K., JING B., 2016 - Effects of bacillus licheniformis on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. *Lipids in Health and Disease* 15, 1, 1-10.
71. ZHOU X., JIN E., LI S., WANG C., QIAO E., WU G., 2015 - Effects of dietary supplementation of probiotics (Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, and Bacillus natto) on broiler muscle development and meat quality. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 39, 2, 203-210.

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Mgr inż. Damian Bień
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
damian_bien1@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

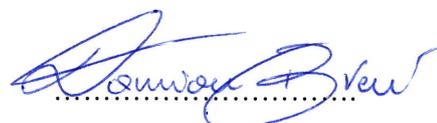
OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu doświadczenia, gromadzeniu i opracowaniu danych, analizie statystycznej, redagowaniu manuskryptu, oraz odpowiedzi na recenzje. Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 70%.

Podpis



mgr inż. Damian Bień

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Mgr inż. Damian Bień
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
damian_bien1@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł.
2022. Changes in lipids metabolism indices as a result of different forms of selenium
supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11. DOI:10.1038/s41598-022-18101-2

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu doświadczenia,
gromadzeniu i opracowaniu danych, analizie statystycznej, redagowaniu manuskryptu, oraz
korekty po recenzji.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 80%.

Podpis



mgr inż. Damian Bień

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Mgr inż. Damian Bień
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
damian_bien1@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Józwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. 2024. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108. DOI:10.2478/aspr-2023-0024

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na realizacji badań, gromadzeniu i opracowaniu statystycznym wyników, redagowaniu manuskryptu, oraz korekty manuskryptu po recenzji.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 80%.

Podpis



mgr inż. Damian Bień

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. Artur Jóźwik, prof. IGHZ PAN
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
w Jastrzębcu
ul. Postępu 36A
05-552 Magdalenka
aa.jozwik@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Jóźwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz omówienia wyników badań.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Podpis



.....
Dr hab. Artur Jóźwik, prof. IGHZ PAN

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. Artur Jóźwik, prof. IGHZ PAN
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
w Jastrzębcu
ul. Postępu 36A
05-552 Magdalenka
aa.jozwik@igbzpan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Jóźwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. 2024. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108. DOI:10.2478/aspr-2023-0024.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w analizach biochemicznych i opisanu wyników badań.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 4%.

Podpis



.....
Dr hab. Artur Jóźwik, prof. IGHZ PAN

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Mgr Misza Kinsner
Zakład Żywienia Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
ul. Instytucka 3
05-110 Jabłonna
m.kinsner@ifzz.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

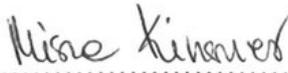
Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 2%.

Podpis



mgr Misza Kinsner

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Mgr Misza Kinsner
Zakład Żywienia Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna
m.kinsner@ifzz.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł.
2022. Changes in lipids metabolism indices as a result of different forms of selenium
supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11. DOI:10.1038/s41598-022-18101-2
mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 4%.

Podpis


.....

mgr Misza Kinsner

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. inż. Paweł Konieczka prof. UWM
Katedra Drobiarstwa i Pszczelnictwa
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 5
10-719 Olsztyn
pawel.konieczka@uwm.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na w opracowaniu założeń metodycznych i pomocy w pisaniu publikacji oraz odpowiedzi na recenzję.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Podpis



dr hab. inż. Paweł Konieczka prof. UWM

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. inż. Paweł Konieczka prof. UWM
Katedra Drobiarstwa i Pszczelnictwa
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 5
10-719 Olsztyn
pawel.konieczka@uwm.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł.
2022. Changes in lipids metabolism indices as a result of different forms of selenium
supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11. DOI:10.1038/s41598-022-18101-2

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na w opracowaniu założeń metodycznych i
pomocy w opracowaniu danych oraz redagowaniu manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 6%.

Podpis



dr hab. inż. Paweł Konieczka, prof. UWM

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. inż. Paweł Konieczka prof. UWM
Katedra Drobiarstwa i Pszczelnictwa
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 5
10-719 Olsztyn
pawel.konieczka@uwm.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Józwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł.
2024. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical
properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and
lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108. DOI:10.2478/aspr-2023-
0024

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na realizacji badań oraz pomocy w
redagowaniu manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 6%.

Podpis



dr hab. inż. Paweł Konieczka prof. UWM

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

dr Małgorzata Łysek-Gładysińska
Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Żeromskiego 5, 25-369 Kielce
malgorzata.lysek-gladysinska@ujk.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

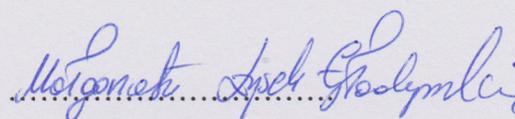
Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz omówienia wyników badań.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Podpis



dr Małgorzata Łysek-Gładysińska

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr inż. Arkadiusz Matuszewski
Katedra Biologii Środowiska Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
arkadiusz_matuszewski1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu doświadczenia oraz analiz laboratoryjnych.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 2%.

Podpis



dr inż. Arkadiusz Matuszewski

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr inż. Arkadiusz Matuszewski
Katedra Biologii Środowiska Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
arkadiusz_matuszewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Józwick Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. 2024. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108. DOI:10.2478/aspr-2023-0024.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz redagowaniu manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 4%.

Podpis



dr inż. Arkadiusz Matuszewski

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
monika_michalczuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Józwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorowaniu doświadczenia oraz pomocy w redagowaniu i korekcie manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 6%.

Podpis



Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
monika_michalczuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł.
2022. Changes in lipids metabolism indices as a result of different forms of selenium
supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11. DOI:10.1038/s41598-022-18101-2

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań, oraz
nadzorowaniu doświadczenia, jak również na analizie danych źródłowych i korekcie
manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 6%.

Podpis



Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
monika_michalczuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Józwik Artur, Matuszewski Arkadiusz, Konieczka Paweł. 2024. Effects of *Cannabis sativa* extract on growth performance, meat physicochemical properties, and oxidative status in chickens challenged with *Clostridium perfringens* and lipopolysaccharide. *Animal Science Papers and Reports*, 42, 81-108. DOI:10.2478/aspr-2023-0024.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorowaniu prac badawczych oraz pomocy w redagowaniu i korekcie manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 6%.

Podpis



Dr hab. Monika Michalczuk, prof. SGGW

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

Lek. wet. Dominika Szkopek
Zakład Żywienia Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
ul. Instytucka 3
05-110 Jabłonna
d.szkopek@ifzz.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

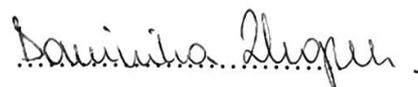
OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Szkopek Dominika, Kinsner Misza, Konieczka Paweł.
2022. Changes in lipids metabolism indices as a result of different forms of selenium
supplementation in chickens. *Scientific Reports*, 12, 1-11. DOI:10.1038/s41598-022-18101-2

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.
Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 4%.

Podpis



lek. wet. Dominika Szkopek

Warszawa, dn. 10.06.2024 r.

dr Anna Wieczorek
Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Żeromskiego 5
25-369 Kielce
anna.wieczorek@ujk.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Bień Damian, Michalczuk Monika, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Jóźwik Artur, Wieczorek Anna, Matuszewski Arkadiusz, Kinsner Misza, Konieczka Paweł. 2023. Nano-sized selenium maintains performance and improves health status and antioxidant potential while not compromising ultrastructure of breast muscle and liver in chickens. *Antioxidants*, 12(4), 1-21. DOI:10.3390/antiox12040905

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz omówienia wyników badań.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Podpis

Anna Wieczorek

dr Anna Wieczorek