MODULACIJSKI UČINCI NATIVNOG PROPOLISA, PRIPRAVKA PLEMENITE PEČURKE I β-GLUKANA NA IMUNOSNE TE PROIZVODNE POKAZATELJE ODBIJENE PRASADI

Špoljarić, Daniel

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:621425

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

1. UVOD

Znatni se napori ulažu u razumijevanje crijevnih infekcijskih bolesti, njihove dijagnoze, uključujući i biologiju uzročnika, otpornosti domaćina i liječenja u intenzivnoj mnoštvenoj proizvodnji svinja. Naprotiv, malo se zna o preventivi tih bolesti s pomoću imunomodulacijskih i nutritivnih strategija, jer su ti problemi do sada bili rješavani dodavanjem subterapijskih doza antibiotskih poticatelja rasta u hranu u svinjogojskoj industriji, radi poboljšavanja proizvodne učinkovitosti. S rastom spoznaja o imunosnom sustavu svinje i njegovoj endogenoj modulaciji (VALPOTIĆ, 2002.), postalo je jasno da egzogena modulacija predstavlja važan profilaktički/terapijski pristup u preventivi/liječenju različitih bolesti svinja, posebice crijevnih poremetnji, s pomoću široke lepeze modifikatora imunosnog odgovora, bioaktivnih tvari koje su istovremeno neškodljive za životinju i okoliš, ali i za konzumente namirnica animalnog podrijetla (VALPOTIĆ i sur, 1989., VIJTIUK i sur., 1993., ŠVER i sur., 1996., VALPOTIĆ, 2000., BOŽIĆ i sur., 2003., VALPOTIĆ, 2009.) i u svijetu (GALLOIS i sur., 2009.). Danas su oni važna sastavnica alternativne strategije nekliničkoj uporabi antibiotika, napose u proizvodnji životinja namijenjenih ljudskoj prehrani, i to posebice kao alternativna profilaksa/terapija za rastući broj mikroba rezistentnih na antibiotike (GALLOIS i sur., 2009.). S obzirom da su potonja istraživanja komplementarna našem pristupu poticanja nespecifične imunosti odbijene prasadi s pomoću modifikatora imunosnog odgovora radi pojačavanja otpornosti na crijevne infekcije bakterijske etiologije, obratili smo pozornost na prirodne tvari s alternativnim potencijalima antibioticima u hrani, kao što su pčelinji propolis (SFORCIN, 2007.), β–glukani polisaharidi iz stanične stijenke pekarskog kvasca (LI i sur., 2005., EICHER i sur., 2006., KOGAN i KOCHER, 2007.), brojnih vrsta gljiva (BARBISON i sur., 2002., BROWN i GORDON, 2003., VAN NEVEL i sur., 2003., SHEN i sur., 2007.), smeđih morskih algi (LEONARD i sur., 2010.), te brojnih biljaka (MAO i sur., 2005., WINDISCH i sur., 2008.), posebice trava, kao što su ječam i zob (O'SHEA i sur., 2010.), te miceliji mnogih vrsta gljiva, jer su makromolekule β–glukana uz glikoproteine i hitin sastavnice stanične stijenke tih vrsta gljiva. Primjerice, miceliji vrsta gljiva šitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*), šizofilan (*Shizophyllum commune*), bijele truleži (*Sclerotinia sclerotiorum*) i njezinih srodnika (*S. glucanicum* i *S. rolfsii*), potom plemenite pečurke ili šampinjona (*Agaricus bisporus*) i njezinih srodnika (*A. blazei, A. sylvaticus*), kovrčaste kokice (*Sparassis crispa*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*), i mešimakobu gljive (*Phellinus linteus*), sadrže β–glukane nazvane prema njihovim izvorima:

lentinan, grifolan, šizofilan, SSG-glukan, skleroglukan ili manan (BARBISAN i sur., 2002.; BROWN i GORDON, 2003.; SHEN i sur., 2007.). Njihovi mogući imunosni i nutritivni modulacijski učinci uglavnom su istraživani na laboratorijskim glodavcima (VETVICKA i sur., 2007., SHEN i sur., 2007.)., 2011). To se napose odnosi na propolis, čiji su imunomodulacijski, adjuvantni, antooksidacijski i protuupalni učinci istraživan na štakoru, mišu, zamorčetu i kokoši (SFORCIN i sur., 2005., MISSIMA i sur., 2010., MA i sur., 2011., FREITAS i sur., 2011.), dok za svinju nismo našli podatke u dostupnim nam izvorima. Također, za svinju nismo pronašli podatke o uporabi praškastih pripravaka osušenih vrsta gljiva u imunosnoj i nutritivnoj modulaciji, pa tako ni za pripravke plemenite pečurke. Naprotiv, izvješća o učincima β–glukana izdvojenog iz pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ili biljne vrste *Astragalus membranaceus* podrijetlom iz Kine, na rast, digestiju i imunosne pokazatelje u odbijene prasadi (MAO i sur., 2005., PRICE i sur., 2010.). Pripravci β–glukana iz pekarskog kvasca *S. cerevisiae* i gljive *Sclerotium rolfsii* pokazali su sposobnost u zaštiti odbijene prasadi od pokusne infekcije F4+ enterotoksigenim sojem bakterije *Escherichia coli* (ETEC) (STUYVEN i sur., 2009.). Međutim, i β–glukani iz ječma i zobi, te iz smeđe morske alge *Laminaria spp.* povoljno su djelovali na neke proizvodne i imunosne pokazatelje tovljenika (O'SHEA i sur., 2010.) i sisajuće prasadi (LEONARD i sur., 2010.). Premda postoje vrlo indikativni podaci o učincima β–glukana na crijevni imunosni sustav miša (gdje se najranije mogu očekivati) (SHEN i sur., 2007.), podaci o učincima glukana na crijevni imunosni odgovor svinje vrlo su rijetki (GALLOIS i sur., 2009.), a podataka za odbijenu prasad ili za sada nema ili nam nisu bili dostupni. Postoje podaci da dodavanje viših koncentracija (2,5%) β–glukana u hranu za sisajuću prasad izaziva porast α- činitelja nekrotiziranja tumora (TNF-α) i mRNA IL-1β, ali također i do porasta mRNA IL1–receptorskog antagonista (IL-1Ra) u sluznici ileuma, nakon što je prasad imunizirana bakterijskim lipopolisaharidom (EICHER i sur., 2006.). U odbijene prasadi pokusno inficirane F4+ ETEC sojem dodavanje pripravaka β–glukana (0,05 do 0,075%) u hranu smanjuje brojnost IgM+ i IgA+ plazma stanice u Peyerovim pločama jejunuma/ileuma i slezeni, ali ne i u mezenterijskom limfnom čvoru u odnosu na kontrolnu prasad (STUYVEN i sur., 2009.). U potonje je prasadi zabilježen, osim jakog porasta serumskih protutijela IgM razreda specifičnih za F4 antigen, i porast brojnosti IgM+ plazma stanica u slezeni što odražava snažan sustavni humoralni imunosni odgovor na infekciju ETEC sojem. Premda nedostatni i nekonzistentni, ovi podaci upućuju na činjenicu da je za poticanje crijevne imunosti nužno utvrditi optimalnu dozu pripravka, što potvrđuju znatno brojniji i povoljniji podaci o učincima β–glukana na sustavnu imunost u svinje (GALLOIS i sur., 2009.).

Potencijali β–glukana u modulaciji sustavne imunosti svinje, posebice urođene imunosti, pobudili su mnogo veće zanimanje, ali su izvješća o učincima pripravaka vrlo oprečna. Pokazalo se da β–glukani imaju protuupalno djelovanje. Naime, odbijena prasada hranjena s dodatkom 0,005% β–glukana u hrani, te imunizirana 14. dana nakon odbića sa bakterijskim lipopolisaharidom, slabije su lučili proupalne citokine IL-6 i TNF-α, a znatno jače protuupalni citokin IL-10 u *in vitro* uvjetima (LI i sur., 2005.). Ovi obrasci lučenja proupalnih/protuupalnih citokina potvrđeni su u *in vivo* uvjetima u prasadi hranjene istim koncentacijama glukana, nakon intraperitonejskog davanja bakterijskog lipopolisaharida radi izazivanja upalne reakcije (LI i sur., 2005.). Zabilježen je i porast sposobnosti fagocitoze, ali ne i brojnosti leukocita u prasadi hranjene β–glukanom iz dviju vrsta smeđih morskih algi (LEONARD i sur., 2010.). U odbijene pak prasadi, uporaba β–glukana iz istih vrsta algi izaziva porast brojnosti monocita i ekspresije mRNA za IL-8 (REILLY i sur., 2010.). Kada tome dodamo podatke o porastu lučenja IL-1β i IL-2 u odbijene prasadi hranjene s dodatkom β–glukana iz biljke *Astragalus membranaceus* (MAO i sur., 2005.), onda razabiremo njihovu nekonzistentnost i nepredvidivost. Slijedom navedenoga, u našim ćemo istraživanjima utvrditi:

- kriterije zdravlja probavnog sustava odbijene prasadi, temeljem imunoloških, fizioloških i mikrobioloških funkcija, kao i proizvodnih pokazatelja, uz normalno funkcioniranje sluznice crijeva i staničnih/molekularnih sastavnica sustavne i crijevne imunosti;
- znanstveno utemeljene preporuke za alternativu antibiotskim poticateljima rasta u hrani nakon potpunog vrednovanja učinaka odabranih modifikatora imunosnog odgovora, propolisa, pripravka osušene plemenite pečurke (za sada neistraženih u svinja) i β–glukana (nedovoljno provjerenog u *in vitro* uvjetima), koje bi bile prepoznate od domaće i međunarodne znanstvene zajednice, ali i prihvaćene od uzgajivača svinja, proizvođača stočne hrane i konzumenata.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Imunosni sustav svinje

Veliki je interes znanstvenika za svinju kao pokusni model u biomedicinskim istraživanjima bolesti čovjeka i to zbog njezinog ksenotransplantacijskog potencijala te zbog gospodarstveno vrlo značajne vrste domaćih životinja kao jednog od najznačajnijih izvora hrane u svijetu (TUMBLESON i SCHOOK, 1996.). Tako, u zadnjih dvadesetak godina ta su se istraživanja uglavnom usmjerena prema imunosnom sustavu svinje i njegovih staničnih i molekularnih sastavnica (BINNS, 1982.)**.** Naime, imunosni je sustav svinje jedinstven u odnosu na druge sisavce (REDDEHASE i sur., 1991.; BINNS, 1994., PABST i ROTHKOTTER, 1999.) pri čemu su njegova glavna obilježja slijedeća: obrnuta građa limfnih čvorova, izravni put emigracije T i B limfocita iz limfnih čvorova u cirkulaciju preko venula s visokim endotelom, neuobičajena građe tonzila i Payerovih ploča napose neisprekidane (od 1 do 3,5 m) dugačke ilealne Payerove ploče, u kojoj u mlade prasadi nema T stanica i interfolikularnih područja, visoki udjeli (10-60%) izvantimusnih dvostrukopozitivnih $CD4^+$ $CD8^+$ T–limfocita, velika populacija $\gamma\delta TCR^+$ 0 limfocita, naročito u mlade prasadi; te izuzetna raznolikost u genskom sustavu koji regulira ekspresiju TCR.

Imunosni sustav u svinja djeluje kroz dva osnovna sustava: urođene i stečene imunosti. Urođena se imunost razvila ranije nego stečena imunost, jer je prisutna u filogenetski nižih kralješnjaka, ali i u beskralješnjaka. S obzirom da pruža zaštitu od mnogobrojnih i različitih antigena iz okoliša naziva se nespecifičnom imunosti, za razliku od stečene koja nastaje nakon dodira s određenim, specifičnim antigenom. Međutim, oba sustava međusobno su povezana zajedničkim efektorskim stanicama i molekulama i preklapaju se u pružanju zaštite. Tako, urođena imunost započinje i regulira odgovor elemenata stečene imunosti preko akutno faznih i protumikrobnih proteina (CRP, haptoglobin, laktoferin, lizozim, laktoperoksidaza), granulocitnih leukocita i mononuklearnih fagocita, te antigen prezentirajućih stanica (APC) i NK-stanica. Nakon dodira sa specifičnim antigenom ili nespecifičnim mitogenima, T- i B- limfociti se senzibiliziraju, brzo proliferiraju (HOSKINSON i sur., 1990.) i diferenciraju u induktorske/upalne $CD4^+$ stanice, Th1 stanice ili staničnog imunosnog odgovora na intracelularne patogene posredstvom aktiviranih makrofaga/citolitičkih $CD8^+$ limfocita ili pak pomoćničko/supresorske $CD4^+$ stanice, Th2 ili humoralnog imunosnog odgovora na izvanstanične patogene mikrobe posredstvom aktiviranih B stanica i proizvodnje specifičnih protutijela (JOHNSON i sur., 2001.). Budući

da urođena (nespecifična) imunost predstavlja prvu liniju obrane od infekcija i nužna je za indukciju/regulaciju stečene (specifične) imunosti, jasno je da u neonatalne prasadi (napose one koja ne posiše dovoljno kolostruma i tako ne stekne pasivnu imunosnu zaštitu) često zakazuje nedovoljno razvijena aktivno stečena imunost. Osim imunodeficijencije u mlade), oslabljene fagocitoze, prisutna je i nedostatna funkcija antigen prezentirajućih stanica (KOVARIK i SIEGRIST, 1998.). U perifernoj krvi neonatalne prasadi brojnost leukocita kreće se od 4,2 do 9 x 10^6 /mL, a populacija tih stanica sastoji se od oko 60% neutrofilnih granulocita i 38% limfocita. Neutrofili su aktivni i brzo migriraju u lumen crijeva nakon inokulacije patogenih sojeva bakterije *E. coli* (YANG i SCHULTZ, 1986.). Međutim, monociti neonatusa su, slično fetalnim makrofagima, funkcionalno nezreli glede *in vitro* fagocitne aktivnosti. Ta se niska aktivnost zadržava tijekom prvog tjedna života, a potom raste do vrijednosti u odraslih životinja. Izravna citolitičnost aktivnost NK-stanica također je prilično niska, dok je ona posredovana protutijelima usporediva s nalazima u starije prasadi (HUH i sur., 1981.). Proizvodnja IFNα nije umanjena u neonatusa (ARTURSSON i sur., 1992.). Već smo naveli da je pri rođenju praseta od elemenata specifične imunosti, u potpunosti razvijen T-stanični odjeljak u limfatičkim tkivima i organima (BROWN i sur., 2006.). Samo u sluznicu crijeva glavni „dotok" T stanica počinje tek nakon rođenja i traje do približno 7. tjedna života (VEGA-LOPEZ i sur., 1993., HAVERSON i sur., 2001., KOVŠCA-JANJATOVIĆ, 2009). Naprotiv, B-stanični odjeljak zastupljen je u timusu, dok ga u slezeni, limfnim čvorovima i crijevu gotovo nema. Nadalje, sustavnu imunost u svinje čine imunosne stanice i njihove efektorske i komunikacijske molekule (imunoglobulini, citokini-monokini i limfokini). Stanice limfoidne i mijeloidne loze nastaju iz matičnih stanica u koštanoj moždini, sazrijevaju u središnjim limfatičkim tkivima (timus, Payerove ploče ileuma kao ekvivalent Fabricijeve burze) i vrše obrambene funkcije u perifernoj cirkulaciji, te u drugim tkivima. U perifernoj krvi odraslih svinja su prema The Merck Manual (1998.) uobičajene sljedeće vrijednosti: leukociti 11-22 x10^9/L, limfociti 35-75%, segmentirani neutrofili 20-70%, nesegmentirani neutrofili 0-4%, monociti 0-10%, eozinofili 0-15%, bazofili 0-3%. U perifernoj krvi svinja T-limfociti čine 45-57%, B-limfociti 26-38%, a oko 5% svrstani su u 0-limfocite (NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.). Do danas je poznato 37 subpopulacija leukocita temeljem imunofenotipske karakterizacije njihovih membranskih diferencijacijski (CD/SWC) biljega (HAVERSON i sur., 2001.). U perifernoj krvi odraslih svinja, u stanju „mirovanja", odnosno imunosnog neaktiviranja, biljezi subpopulacija T- limfocita zastupljeni su u različitim udjelima: TCRαβ (14-34%), TCRγδ (31-39%), CD2 (58-72%), CD4 (23-43%) i CD8 (17-39%), što odražava i relativnu brojnost

tih stanica. Podskupina dvostruko pozitivnih $CD4^+CD8^+$ s memorijsko-citolitičkom funkcijom (ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.) prisutna je u izvantimusnim prostorima (za razliku od drugih vrsta u kojih je prisutna samo u timusu tijekom razvoja) s više od 15% (TOMAŠKOVIĆ, 1997.) i smatra se nezrelim T- limfocitima. U perifernoj krvi ima ih više od 60% (PESCOVITZ i sur., 1994.), a prisutni su također u odjeljcima crijevnog imunosnog sustava (ZUCKERMAN i sur., 1996.). Najpouzdaniji biljeg T stanica jest CD3 molekula, koja je uvijek udružena s TCR (PESCOVITZ i sur., 1998.). Od ukupnog broja limfocita na B stanice otpada 13-38% (TIZARD, 1996.). Tijekom sazrijevanja, na površini B limfocita pojavljuju se i drugi diferencijacijski biljezi: CD1, SWC7 i CD21 (DENHAM i sur., 1994.), a njihova fenotipska ekspresija razlikuje se ovisno o tkivu/organu svinje (TOMAŠKOVIĆ, 1997., ŠVER, 2001.; KOVŠCA-JANJATOVIĆ, 2009.). Istraživanja svinjskih CD/SWC antigena u okviru tri Workshopa (Budimpešta, 1992., Davis, CS, SAD, 1995 i Ludhiana, Indija, 1998.) rezultirala su otkrićem 6 vrsno specifičnih biljega, od kojih je najzastupljeniji SWC1 (SAALMŰLLER i sur., 1994.). Dio limfocita periferne krvi (koji imaju leukocitne biljege CD45 i CD44, te molekule MHC I) ne može se temeljem površinskih biljega svrstati ni u T niti u B stanice, već su kao $CD2^-$ $SWC1^+$ stanice, koje nemaju ni CD4 ili CD8 biljege niti površinske imunoglobuline (Ig) ili molekule FcR/MHC II, nazvani 0 - limfocitima (BINNS, 1994.). Značajno su zastupljeni u mlade prasadi, ali za razliku od ostalih sisavaca ne pripadaju NK-stanicama (FERGUSON i sur., 1986.). Osim tri glavna izotipa svinjskih Ig (IgM, IgG i IgA), molekularna i genetička istraživanja otkrila su da imunoglobulin G (IgG) ima 5 podrazreda (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 i IgG4 (BUTLER i BROWN, 1994). U serumu svinje, 88% od ukupnih imunoglobulina odnosi se na IgG (prosječna koncentracija iznosi 21,5 g/L), u kolostrumu oko 80% (PORTER i ALLEN, 1972.), a u mlijeku svega 20-30% (CURTIS i BOURNE, 1971.). Imunoglobulin A (IgA) čini oko 3% serumskih (prosječna razina 1,8 g/L, 14% kolostrumskih i 82% u mlijeku, dok je imunoglobulin M (IgM) prisutan u serumu s 14%, 5-6% u kolostrumu, i 18% u mlijeku. Svinjske imunosne i druge stanice (napose neuroendokrine) proizvode brojne vrste imunosnih, protuupalnih i hematopoetskih citokina i kemokina (MURTAUGH, 1994.), kao i imunomodulacijskih neurotransmitera (KOON i POTHOULAKIS, 2006.). Također je otkrivena i prisutnost uobičajenih protuvirusnih IFNα, β i ω, kao i imunosnog IFNγ (LaBONNARDIERE i sur., 1994.).

2.2. Kolidijareje i kolienterotoksemije odbijene prasadi

Kolidijareja i kolienterotoksemija je složena bolest u čijem nastanaku sudjeluju hranidbeni, fiziološki i imunološki čimbenici, ali često i utjecaji iz okoliša kojima je izložena prasad (MOON i BUNN, 1993.). Proljevi (kolidijareja i kolienterotoksemija) u odbijene prasadi najčešće su posljedica kolonizacije tankog crijeva enterotoksogenim sojevima bakterije *E. coli* posljedica čega su brojna uginuća prasadi, povećani zahtjevi za antibioticima, odnosno značajni ekonomski gubici kao posljedica zaostajanja u rastu i povećanom periodu potrebnom da bi svinje dosegle klaoničku težinu (NABUURS, 1998., HAMPSON i sur., 2001.). U suvremenom intenzivnom svinjogojstvu bolest se najčešće pojavljuje 5 do 10 dana nakon odbića prasadi, odnosno u periodu kad se prasad u kratkom vremenu mora prilagoditi na niz promjena u svom organizmu, okolišu i hranidbi. Tako, na osnovi literaturnih podataka, najveći problem u suvremenom svinjogojstvu, osobito kod odbijene prasadi predstavlja infekcija tankog crijeva enterotoksogenim sojem (ETEC) *E. coli* (DACKO i sur., 2004.). U odbijene prasadi najčešći su ETEC sojevi koji posjeduju F4 ili F18 fibrijske adhezine, a oni omogućavaju naseljavanje sluznice tankog crijeva tako što se vežu uz specifične receptore na resicama epitelnih stanica, a posljedica čega je povećano izlučivanje H_2O, Na+ i Cl-, smanjena apsorpcija tekućine, dehidracija te acidoza kao posljedica prekomjernog gubitka tekućine i $NaHCO_3$ iz organizma.

2.3. Imunomodulacija

Imunomodulacija je jedan od najnovijih terapijskih mogučnosti u inventaru veterinarske kliničke imunologije. Naziv imunomodulacija općenito se upotrebljava za označavanje farmakologijske manipulacije imunosnim sustavom.Ta modulacija podrazumijeva upotrebu tvari koje sposobnost mijenjanja jačine, ali i smjera imunosne reakcije. Međutim, danas se zna da i sam imunosni sustav može modulirati svoje aktivnosti s pomoću citokina, glikoproteinskih molekula koje sintetiziraju imunosne stanice. Imunomodulacija uključuje porast jačine imunosnog odgovora ili imunostimulaciju, pad jačine ili imunosuoresiju te oporavak oslabljenog imunosnog odgovora ili imunorestoraciju. Nužnost i opravdanost suprimiranja funkcije imunosnog sustava jasno su spoznate pri transplantaciji tkiva i organa i te u slučaju pojave alergijskih i autoimunih bolesti. Medicinski izazvana supresija nema praktičnog značaja u proizvodnji i uzgoju domaćih životinja namjenjenih prehrani. Naprotiv,

mnogo je pozornosti posvećeno stimulaciji imunosti domaćih životinja od značenja za veterinu radi pojačavanje njihove aktivnosti prema bolestima. Specifična imunomodulacija podrazumijeva ciljanu promjenu u odgovoru imunosnog sustava na podražaj određenim antigenom, kao što se to postiže vakcinacijom (BEVERLY, 1997.), dok nespecifična imunomodulacija podrazumijeva niz složenih promjena koje rezultiraju promijenjenim stanjem imunosnog sustava na širok raspon antigena. Programi vakcinacije vjerojatno su najbolji primjer poticanja specifične imunosti u domaćih životinja namijenjenih ljudskoj prehrani (svinja, govedo, ovca, koza, kunić) i domaćih životinja pratitelja čovjeka (konj, pas, mačka). Kada, međutim, više zaraznih uzročnika sudjeluje u patogenezi određene bolesti ili kada je učinak uzročnika nedvojbeno izazvan stresnim uvjetima okolisa, uporaba nespecifičnih stimulatora stanične i humoralne imunosti pruža mnoge prednosti u odnosu na suvremene terapijske i profilaktičke pristupe (BLECHA i CHARLEY, 1990.). Iznenađujuča je činjenica u istraživnju imunomodulacije njezino djelomično zapostavljanje nakon uspjeha kemoterapije i vakcinacije. Postupnim shvaćanjem da vakcine i kemoterapeutici, uz znatne uspjehe, imaju i određena ograničenja u sprječavanju i liječenju bolesti, posebice kad se radi o kemoterapiji onih virusne etiologije, ponovno je usredotočena pozornost na imunostimulatore kao sredstva za umanjivanje posljedica bolesti stoke (BLECHA, 1998.). Danas se zna da neki spojevi ili molekule, nazvani modifikatorima imunosnog odgovora (MIO), kadri mijenjati normalni imunosni odgovor domaćina i pojačati njegovu nespecifičnu otpornost na tumore, gljivična, bakterijske i virusne infekcije. Različite su kemijske i biološke tvari bile uporabljene i vrednovane kao MIO u domaćih životinja. Drugi sinonim za MIO koji se često rabe su: modifikatori biološkog odgovora, imunomodulatori, imunopotencijatori i imunoterapijska sredstva. Premda postoji opsežna literatura o upotrebi MIO-a u veterinarskoj medicini samo je u nekoliko slučajeva neka od tih imunosno aktivnih tvari postala terapijski proizvoz za svakodnevnu primjenu. Većina istraživanja MIO-a u humanoj medicini usmjerena je prema imunomodulaciji u pacijenata oboljelih od raka i pokusnim modelima za procjenu djelotvornosti MIO-a u imunoterapiji tumora i metastaza. Veterinarska medicina ima sličan interes pri liječenju domaćih životinja pratitelja čovjeka. Međutim, u životinja koje se uzgajaju za prehranu ljuditemeljni cilj nespecifične imunomodulacije jest uspostavljanje pojačana imunosne kompetencije u vrijeme kad je životinja izložena jednom ili nekolicini uzročnika bolesti, ili pak kada je imunosno kompromitirana (BLECHA i CHARLEY, 1990.). Slijedom toga preporučljiva je primjena nespecifične imunomodulacije u najmanje tri različita stanja : tijekom neonatalnog razdoblja kada imunsni sustav nije funkcijski razvijen, za vrijeme imunosupresije ili uzročnikom

bolesti. Imunomodulacija u domaćih životinja mora udovoljavati kriterijima koji nisu od značenja u području humane medicine. Prvenstveno, ne smiju se pojaviti ostatci MIO-a u mesu, mlijeku i jajima a posebice ako MIO može postati toksičan, teratogen, kancerogen, ili pak kada nakon dužeg vremena izaziva popratne pojave nepoželjne a zdravlje čovjeka i životinje. Također, takva tvari moraju biti kompatibilne s okolišem.Moraju biti prikladne za primjenu, djelovati u razdoblju nužnom za postizanje željenog učinka i ne smiju biti skupe za praktičnu upotrebu u velikim uzgojima stoke. U takvim bi uzgojima bili prikladniji oni MIO-i koji su aktivni kada se daju oralno. Osim toga MIO-i bi trebali biti kompatibilni sa širokim izborom lijekova, uključujući antibiotike i antihelmintike,a ako se daju sa vakcinama trebali bi djelovati poput adjuvansa (MULCAHY i QUINN, 1986.). Premda je vakcinacija uspješna u kontroli gospodarski važnih bolesti, upak jos nije u stanju umanjiti velike gubitke mladih životinja u masovnim uzgojima svinja i peradi. U slučajevima kad više mikroorganizama sudjeluje u patogenezi neke bolesti ili kad je djelovanje bolesti dodatno pojačano stresnim činiteljima iz okoliša, nespecifični imunostimulatori pružaju brojne prednosti u odnosu na raspoloživa terapijska i profilatička sredstva. Niz dokazanih djelotvornosti nespecifičnih imunostimulatora, kao i željene osobitosti još neprovjerenih MIO-a, tvari koje se doslovno otkrivaju svakodnevno, mogu se sažeti u nekoliko temeljnih ciljeva imunomodulacije:

1. Izazivanje jačeg i učinkovitijeg imunosnog odgovora na one uzročnike koji uzrokuju kliničke i supkliničke oblike bolesti

2. Poticanje brzog uspostavljanja nespecifične i specifične imunosti u novorođenih i mladih primljivih životinja

3. Pojačavanje lokalnih zaštitnih imunosnih reakcija na mjestima veće izloženosti antigenima uzročnika bolesti, kao što je vime u visokomliječnih krava te gastrointestinalni i respiracijski sustavi u neonatalne prasadi i preživača

4. Sinergističko djelovanje s vakcinalnim imunogenima i produživanje trajanja specifičnog staničnog i humoralnog imunosnog odgovora nakon vakcinacije

5. Nadvladavanje imunosupresijskih učinaka stresa na organizam uzrokovanog sa mikroorganizmima koji izravno oštečuju stanice imunosnog sustava, ometaju njihovu funkciju ili uzrokuju perzistentne infekcije.

6. Selektivna stimulacija određenih komponenti imunosnog sustava ili nespecifičnih imunosnih mehanizama koji pružaju učinkovitu zaštitu od umnažanja patogenih mikroorganizama, posebice onih protiv kojih nema cjepiva

7. Održavanje imunosnog nadzora na visokoj razini radi brzog prepoznavanja i pravodobnog eliminiranja neoplastičnih i ostalih promjena u organizmu životinje

Danas je s pomoću visokosofisticiranih pokusnih tehnika i zahvaljujući sve većim saznanjima o funkcioniranju imunosnog sustava moguće razvrstati velik broj tvari izdvojenih iz biljnih, životinjskih ili ljudskih tkiva te iz bakterija, virusa, parazita kao fiziološke i mikrobne MIO-e. Općenito MIO-i se nogu podijeliti na endogene , koji se stvaraju u organizmu domaćina (kao što su primjerice timusni hormoni, citokini, interferoni, glukokortikoidi, neuropeptidi) i proizvod su njegova genoma, i egzogene, koji nisu proizvod genoma sisavaca (već su mikrobnog podrijetla te sintetski proizvodi ili sastojci hrane), ali čiji je mehanizam djelovanja uključuje i poticanje stvaranja endogenih MIO-a i promjenu imunosnog odgovara jedinke (ROTH, 1998.). Racionalan odabir odgovarajučeg MIO-a trebao bi se temaeljiti na spoznajama o kinetici uspostavljanja imunokompetencije tijekom ontogeneze imunosnog sustava vrste i jedinke te na saznanjima o podrijetlu i prirodi imunosupresijskih događaja u domaćina. Komponente imunosnog sustava najčešće su izložene djelovanjima MIO-a uključuju T i B limfocite, monocitno – makrofagni sustav, granulocite, a u slučajevima nekih zaraznih bolesti te neoplazmi uzrokovanih virusima prirodne ubilačke stanice (NK stanice). Sustav komplementa, citokini, interferoni i lizozim također su prikladni za farmakološku manipulaciju MIO-m (QUINN, 1990.).

Mehanizam djelovanja MIO-a, u većini slučajeva, nije dobro razjašnjen. Međutim, pouzdano se zna da ne djeluje izravno na uzročnika, već mijenja staničnu razinu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i /ili gvanozin monofosfata (cGMP), moduliraju aktivnost imunosnih stanica, a time zapravo pojačavaju ili smanjuju učinkovitost obrambenih mehanizama domaćina. Ovako izjenjena metabolička aktivnost na staničnoj razini može se postići na više načina, ali djelatni mehanizmi nisu potpuno jasni. Mnoge tvari koje izazivaju porast razine cAMP-a poput glukokortikoida, djeluju imunosupresivni i inhibiraju efektorsku funkciju limfocita. Naprotiv, tvari koje povisuju razinu cGMP-a kao što to čine biljni lektini, bakterijski lipopolisaharidi i interleukin – 1, pojačavaju aktivnost limfocita i djeluju imunostimulacijski. Stanice monocitno – makrofagnog sustava često odgovaraju na imunomodulaciju pojačanom citolitičkom reakcijom protiv mikrobnih i tumorskih ciljanih stanica (EZEKOWITZ i GORDON, 1984.). Djelovanje mnogih MIO-a na neutrofile izaziva povečanu protumikrobnu aktivnost stanica koja se očituje ubrzanim stavaranjem superoksidnih aniona, proizvodnjon prostaglandina E i oslobađanjem lizosomskih enzima (ABRAMSON i sur., 1984.). S obzirom na činjenicu da je većina poznatih MIO-a djeluje na više od jedne populacije imunosnih stanica, konačni će učinak ovisiti o relativnoj primljivosti tih stanica za uporabljeni MIO te o njihovoj ulozi pri uspostavljanju nespecifičnog ili specifičnog odgovora (ROTH, 1988.). Djelotvornost nekog MIO-a može se vrednovati

dodavanjem djelatne tvari stanicama u in vitro pokusima ili izravnim davanjem tvari životinji. U nekim slučajevima isti MIO može pokazivati različitu djelotvornost u in vitro i in vivo uvjetima. Osim toga potrebno je provjeriti biološku kinetiku svakok pojedinog MIO-a radi utvrđivanja optimalnog doziranja, vremena davanja i trajanje djelovanja. Konačno vrednovanje učinkovitosti MIO-a u pojačavanju imunosnog odgovora mora se provesti na najmaje tri modelska sustava:

1. nakon pokusno izazvanog stresa
2. tijekom imunosupresije izazvane egzogenim glukokortikoidima
3. nakon izazivačke infekcije

Kriteriji za izbor MIO-a moraju se temeljiti na spoznajama o imunosnom profilu domaćina (najčešće pokusnog glodavca) i o prirodi imunosupresije. Među istraživanim MIO-ima posebno ističemo BPM, pripravak inaktiviranog virusa *Parapox ovis*, za kojeg je barem dijelom utvrđen mehanizam djelovanja. Zna se da gubitak njegove virulencije više pogoduje nastanku njegove imunostimulacijske nego imunizacijske aktivnosti. Sve se više uviđa da su učinci kemoterapije i vakcinacije, protiv mnogih složenih bolesti domaćih životinja uvjetovanim stresnim činiteljima iz okoliša dosegli svoj vrhunac. Već je i danas moguće na odgovarajući način farmakološki modulirati imunosni odgovor s obzirom na uočeno kliničko stanje životinje ili na predvidljive promjene u uvjetima okoliša koje bi mogle u životinja stvoriti predispoziciju za nastanak imunosupresije, odnosno za pojavu infekcijskih bolesti. Veliki izbor MIO-a nudi mogućnost pojačavanja naspecifične i specifične imunosti u životinja te posljedično ublažavanje stresa i /ili infekcijskih bolesti. Međutim, ne može se očekivati da će bilo koji do sada poznatih MIO-a biti u stanju spriječiti ili ublažiti imunosupresije izazvane mnogobrojnim uzrocima i/ili infekcija različite etiologije. Bolje razumijevanje mehanizma stimulacije i supresiju imunonog odgovora domaćina izazvanog sa MIO-om, uputit će i na razvoj novootkrivenih ili sintetiziranih specifičnih tvari poznate i predvidljive aktivnosti, bilo za povečanje otpornosti na stresore i patogene organizme ili pak za smanjenje učinaka štetnih imunosnih reakcija.

2.3.1. Modifikatori imunosnog odgovora

Danas se uz brojne sintetske spojeva koji pokazuje imunomodulacijsku aktivnost i veliki broj tvari izdvojenih iz biljnih, životinjskih ili ljudskih tkiva, te iz bakterija, virusa, i parazita opisuju kao modifikatori imunosnog odgovora (MIO) (POLI, 1984., MULCAHY i QUINN, 1986.) Modifikatori imunosnog odgovora dijele se na endogene, koji se fiziološki stvaraju u

organizmu domaćina te su proizvod njegova genoma, i na egzogene, koji nisu proizvod genoma sisavaca (već su mikrobnog podrijetla, sintetski proizvodi ili sastojci hrane), ali čiji mehanizam djelovanja uključuje i poticanje stvaranja endogenih modifikatora imunosnog odgovora i promjenu imunosnog odgovora jedinke (ROTH, 1988.) (Tablica 1).

Tablica 1. Podjela modifikatora imunosnog odgovora (VALPOTIĆ i sur., 2004.).

PODRIJETLO	Oblik imunomodulacije	Vrsta modifikatora imunosnog odgovora
ENDOGENI	Fiziološka	Timusni hormoni Citokini i interleukini (limfokini, monokini) Interferoni (α, β, γ, ώ) Činitelj nekrotiziranja tumora (α, β) Činitelj stimuliranja kolonija C-reaktivni protein i neopterini Imunogenična DNA i RNA
	Neuroendokrina	ACTH i glukokortikoidi Hormon rasta i prolaktin Tireoidni stimulirajući hormon Opioidni neuropeptidi (enkefalini, endorfini, dinorfini i neurotenzin)
	Promijenjeno vladanje	Međudjelovanje mozga i imunosnog sustava
EGZOGENI	Mikrobiološka	Bakterije i njihovi derivati (*P. acnes, E. coli, M. bovis, S. pyogenes, L. casei, S. olivoreticuli, S. cerevisiae, K. pneumoniae,* lipopolisaharidi, muramildipeptidi, peptidoglikani) Gljivice i njihovi derivati (*T. inflatum, L. edolus, C. albicans)* Virusi (Duphamun-inaktiviran avipox virus, Baypamun®-inaktiviran *Parapox virus ovis*)
	Kemijska	Levamisol Avridine Polianionski kopolimeri Izoprinozin Indometacin Derivati askorbinske kiseline Muramil dipeptid Ciprofloksacin i ofloksacin Organski spojevi germanija (^{132}Ge)
	Nutritivna	Proteini Vitamini (A, D, E, B-kompleks, C) Minerali (selen, željezo, cink, bakar, kobalt)

Odabir odgovarajućeg modifikatora imunosnog odgovora temeljiti se na spoznajama o kinetici uspostavljanja imunokompetencije tijekom ontogeneze imunosnog sustava vrste i jedinke, te na saznanjima o podrijetlu i prirodi imunosupresijskih događaja u domaćina (KEHRLI i ROTH, 1990.). Molekule imunosnog sustava koje su najčešće izložene djelovanjima modifikatora imunosnog odgovora su T- i B- limfociti, monocitno-makrofagni

sustav, granulociti, prirodne ubilačke stanice i ubilačke stanice (*engl.* nature killer-NK i killer-K cells). Sustav komplementa, citokini, interferoni i lizozim također su podesni za farmakološku manipulaciju pomoću modifikatora imunosnog odgovora (QUINN, 1990.). Iako mehanizam djelovanja modifikatora imunosnog odgovora nije dobro razjašnjen, pouzdano se zna da ne djeluju izravno na uzročnika, već mijenjaju staničnu razinu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i/ili gvanozin monofosfata (cGMP), odnosno da moduliraju aktivnost imunosnih stanica čime pojačavaju ili smanjuju učinkovitost obrambenih mehanizama domaćina (COFFEY i PILKINGTON, 1989.). Tako glukokortikoidi koje izazivaju porast razine cAMP djeluju imunosupresivno i inhibiraju efektorsku funkciju limfocita. Nasuprot njima, tvari koje povisuju razinu cGMP, poput biljnih lektina, bakterijskih lipopolisadarida i interleukina-1, pojačavaju aktivnost limfocita i djeluju imunostimulacijski. Stanice monocitno-makrofagnog sustava protiv mikrobnih i tumorskih stanica odgovaraju na imunomodulaciju pojačanom citolitičkom reakcijom (ABRAMSON i sur., 1984., EZEKOWITZ i GORDON, 1984., MURRAY, 1984., MELTZER i sur., 1987.). Poznata je činjenica da modifikatori imunosnog odgovora najčešće djeluje na više od jedne populacije imunosnih stanica, pri čemu njihov modulacijski učinak ovisi o primljivosti tih stanica za uporabljeni modifikator imunosnog odgovora, te o njihovoj ulozi pri uspostavljanju nespecifičnog ili specifičnog imunosnog odgovora (ROTH, 1988.).

2.3.2. Nespecifični modifikator imunosnog odgovora

U okviru veterinarske medicine istražuje se brojni pripravci koji mogu utjecati na stvaranje nespecifične imunosti pri čemu moraju udovoljavati određenim zahtjevima, posebice ako se daju životinjama namijenjenim ljudskoj prehrani. Naime, takvi pripravci ne smiju biti toksični, teratogeni, mutageni, pirogeni, ne smiju ostavljati rezidue ili svoje štetne metabolite u tkivima. Nadalje, moraju biti kompatibilni s drugim lijekovima i vakcinama, ne smiju biti škodljivi za samu životinju, ali ni za okoliš te moraju imati ekonomsku opravdanost (QUINN, 1990.).

2.3.2.1. Plemenita pečurka (*Agaricus bisporus*)

Gljive su eukariotski organizmi koji imaju stanice obavijene staničnom stjenkom čija primarna uloga je osigurati čvrstoću stanice. Njhove stanične stjenke građene su u suhoj tvari od 89 % polisaharida, od 3 % do 20 % proteina, te u manjim udjelima od lipida, minerala i pigmenata (MOHAČEK-GROŠEV, 2001.). Polisaharidi su fibrilarne komponente kojih je glavna komponenta hitin, dok su osnovne komponente matriksa polisaharidi poput manana i α- i β-(1→3)-glukana (CHEUNG, 1997.). U kontroliranim uvjetima uzgoja, plemenita pečurka (*Agaricus bisporus)* je najčešće uzgajana vrsta gljiva koja u 5,52 % suhe tvari sadrži 59,44 % proteina, 31,51 % ugljikohidrata i 6,32 % pepela (NOVAK, 1997.). Plemenite pečurke su izvor antioksidansa u prehrani, što se u najvećoj mjeri pripisuje prisutstvu polifenolnih spojeva, ali i α- i β-tokoferola, karotenoida, askorbinske kiseline te ergotioneina (DUBOST, 2007., ELMASTAS i sur., 2007., BARROS i sur., 2008.). Suhi prah plemenite pečurke, istraživan *in vivo* na modelu štakora, pokazao je sposobnost smanjivanja koncentracije šećera i kolesterola u krvi (JEONG i sur. 2010.). Nadalje, dobre nutritivne karakteristike plemenite pečurke, s niskim udjelom masnoća i visokim udjelom proteina te ugljikohidrata, među kojima su najzastupljenija dijetalna vlakna, čine ih vrlo prihvatljivom namirnicom ne samo za čovjeka, već i za domaće životinje namijenjene ljudskoj prehrani, kao što su svinje i perad. Pri tomu, β–glukani izdvojeni iz micelija plemenite pečurke i njezinih srodnika (*A. blazei, A. sylvaticus*) imaju protutumorski i imunostimulacijski učinak na sustavnu i lokalnu (crijevnu) imunost životinja (BARBISAN i sur., 2002., BROWN i GORDON, 2003., SHEN i sur., 2007). Tako su GIANNENAS i sur. (2010.) utvrdili da pripravak osušene plemenite pečurke povoljno djeluje na crijevnu histmorfologiju i populaciju komenzalnih mikrobiota u tovnih pilića, kao i na proizvodne pokazatelje i antioksidativni status njihova mesa. S obzirom da je danas većina istraživanja usmjerena na pronalazak biomolekula koje mogu pozitivno ili negativno modificirati odgovor imunoloških stanica, polisaharidi gljiva, posebice β-(1→3)-glukani opisuju se kao modulatori biološkog odgovora (engl. biologic response modifiers, BRMs) (DABA i EZERONYE, 2003.). Pri tome ZEKOVIĆ (2005.) napominje da se imunofarmakološka aktivnost β-glukana opisuje kao nespecifična imunomodulacija u okviru koje se uključuju različiti imunološki putevi, poput aktivacije makrofaga, stimulacije T-stanica, povećane proizvodnje antitijela i aktivacije NK stanica („natural killer cells“) (ZEKOVIĆ, 2005., FORTES i sur., 2006.). β-glukani se mogu vezati i na specifične receptore na staničnim membranama neutrofila,

eozinofila i NK stanica, kao i na neimunološke stanice, poput endotelijalnih stanica, alveolarnih epitalnih stanica i fibroblasta, i aktivirati ih (ZEKOVIĆ, 2005.).

2.3.2.2. Nativni propolis

Suvremena medicina pridaje sve veće značenje pčelinjim proizvodima naročito u terapiji mnogih bolesti (apiterapija). Interes za ljekovita svojstva pčelinjih proizvoda kao i protutumorski učinak istih, porastao je u zadnjih desetak godina, gdje se suvremenim metodama istražuje sastav pčelinjih proizvoda zbog biološke učinkovitosti na organizam. Sam naziv propolis prema nekim autorima potječe od grčkih riječi pro (pred, za) i polis (grad), tj. za zaštitu grada (odnosno košnice), a prema drugima od riječi propoliso, koja na grčkom ili na latinskom znači zamazivati, zaglađivati. Propolis je smolasta supstanca koju pčele radilice sakupljaju s pupoljaka ili kore drveća i šiblja. Razlozi koji potiču pčele na sakupljanje propolisa još nisu dovoljno razumljivi. Smatra se da dinamika sakupljanja propolisa ovisi o godišnjem dobu, a ne o nazočnosti smole na bilju. Propolis se sakuplja krajem ljeta i u jesen i vrlo rijetko u proljeće. Posebno se očituje skupljanje veće količine propolisa u kasno ljeto i jesen kada pčele s njime pokušavaju zatvoriti sve pore i pukotine na košnici u cilju obrane klupka od visoke hladnoće i nametnika koji bi kroz njih mogli ući u košnicu. Sklonost raznih vrsta pčela za sakupljanje propolisa nije jednaka. Kavkaska pčela (*Apis mellifera caucasica*) koristi velike količine propolisa (300 g), dok talijanska i ukrajinska manje. Pčele rasprostranjene u Indiji *Apis dostra*, *Apis indica* i *Apis florea*, te afrička podvrsta obične medonosne pčele (*Apis mellifera scutellata*) ne sakupljaju propolis ili ga sakupe u neznatnoj količini (ORŠOLIĆ i sur., 2010.). Propolis služi pčelama za premazivanje unutrašnjosti košnice, čime postižu bolje očuvanje topline zimi, čuvanje košnice od propuha, vremenskih nepogoda i potresa. Također propolisom poliraju stanice saća koje služe kao skladišta za med, cvjetni prah i kao kolijevka za ličinke. Propolis služi pčelama i za spriječavanje zaraza u košnicama i za balzamiranje uljeza koje ne mogu izbaciti. Propolis u košnici nije samo građevni materijal već, zahvaljujući lako hlapljivim eteričnim uljima, ima izrazit protumikrobni učinak. Propolis je smolaste konzistencije. Žuto-zelene do smeđe-crvene boje. Dužim stajanjem propolis postaje tamniji. Boja varira o području sa kojega je propolis sakupljen (tj. s kojih su ga biljaka pčele sakupile). Pčele sakupljaju propolis sa više od 60 različitih vrsta biljaka. Duljim čuvanjem postaje tamniji i gubi plastičnost. Na temperaturi iznad 30°C je mekan i ljepljiv, a ispod 15°C krut i čvrst. Ima

specifičan miris koji podsjeća na iglice bora, a pri sagorijevanju daje tipični miris tamjana. Propolis je specifično gorkog okusa. Specifična težina propolisa je oko 1,112-1,136. Temperatura topljenja propolisa je od 80 do 105˚C zbog većeg broja sastavnica. Razna otapala otapaju pojedine sastavnice propolisa, ali niti jedno ga ne otapa u potpunosti. U toploj vodi odvaja se od voska i tone na dno posude, dok vosak ispliva na površinu. Topivost propolisa u vodi je slaba (7-11%). Alkohol otapa propolis na hladnom (60-70%). Najbolja topljivost se postiže mješavinom različitih otapala: eter + alkohol, kloroform + alkohol, toluol + alkohol i dr. Topljivost ovisi o temperaturi i trajanju izdvajanja sastavnice. Propolis se sastoji od 50-55% smola, 30% aromatičnih eteričnih ulja i oko 5% cvjetnog praha. Propolis sadrži preko 300 različitih sastavnica. Osnovne sastavnice propolisa su flavonoidi, ali pored toga on sadrži niz organskih kiselina, aldehida, terpena, estera alkohola, etera, minerala, aminokiselina, 22 minerala, najmanje 7 vitamina (posebno se ističu vitamini B kompleksa) i dr. (MARCUCCI, 1995.) Farmakološki najvažniji sastojci propolisa su flavonoidi, te različiti fenoli i aromati koji su odgovorni za njegovu biološku aktivnost. Sastavnice propolisa koje se ne otapaju u vodi i organskim otapalima su još nepoznate. Takve netopive sastavnice propolisa i dalje su predmet istraživanja. U usporedbi s drugim pčelinjim proizvodima, propolis je najslabije istražen. Sastav propolisa prije svega ovisi o biljnim vrstama s kojih je sakupljen. Osim ljepljivih biljnih sastavnica, u propolisu se nalaze različiti tipovi sekreta žlijezda slinovnica (lipofilne tvari, sluz, ljepilo, ulje, a moguće i vosak) ili izlučevine (smola, mliječni sok biljke) (ORŠOLIĆ i sur., 2009.) čime se značajno mijenja sastav propolisa nakon njegova skupljanja Vodena otopina propolisa može se uporabiti oralno i parenteralno što poboljšava reapsorpciju i poboljšava učinkovitost sastavnica (JOSIPOVIĆ i ORŠOLIĆ, 2008.) Isti autori pokazali su da predobrada s vodenom otopinom propolisa povećava zaštitu životinja od različitih infekcija Propolisne sastavnice značajno utječu na nespecifičnu zaštitu životinja. Istraživanja DIMOVA i suradnika (1988.) sugeriraju da propolis stimulira makrofage, koji su glavni čimbenik zaštite od širenja bakterija i gljivica, a time povećava preživljavanje zaraženih životinja i ljudi te pokazuje izrazitu obnovu imunološkog sustava. Propolisne sastavnice utječu na specifične i nespecifične mehanizme imunološke obrane, primjerice oslobađanje čimbenika inhibicije migracije, fagocitozu makrofaga, formiranje rozeta i povećanje broja stanica koje stvaraju protutijela (MANOLOVA i sur., 1987.). Također, potvrđeno je da vodena otopina propolisa potiče makrofage na proizvodnju različitih biološko aktivnih čimbenika, primjerice, čimbenika nekroze tumora (TNF), komponenti komplementa, reaktivnih metabolita kisika i dr. (ORŠOLIĆ, 2012.) je pokazao da flavonoidi iz propolisa utječu na biosintezu limfocitnog

interferona, čije djelovanje može biti dvojako: direktno (citotoksično djelovanje) i imunostimulativno. Također, neke sastavnice propolisa inhibiraju nastanak metabolita arahidonske kiseline i oslobađanje prostanglandina, tromboksana i leukotrijena u upalnoj reakciji, koji utječu na različite biološke odgovore u upalnim bolestima, uključujući kemotaksiju, hormonsku sekreciju, ionski transport i različite enzimske funkcije (ŠVER i sur., 1996.). Nakon obrade vodenom otopinom propolisa povećava se broj i metabolička aktivnost polimorfonuklearnih leukocita, što govori da vodena otopina propolisa ne utječe samo na metaboličku aktivnost makrofaga, nego i drugih stanica. Aktivacija makrofaga važna je za imunološka svojstva propolisa, budući da makrofagi sudjeluju u regulaciji imunološke reakcije i aktivaciji B- i T-stanica.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

U suvremenom svinjogojstvu znatni se napori ulažu u razumijevanje crijevnih infekcijskih bolesti, njihove dijagnoze, uključujući i biologiju samih uzročnika. Međutim, do danas se vrlo malo se zna o preventivi tih bolesti s pomoću imunomodulacijskih i nutritivnih strategija, iz razloga što se problemi većinom rješavaju dodavanjem subterapijskih doza antibiotskih poticatelja rasta u hranu pri ćemu se koriste kako za unapređivanje rasta, tako i za kontrolu crijevnih infekcija tijekom kritičnih razdoblja kao što je odbiće prasadi. S obzirom da se gore opisani zdravstveni problemi javljaju bez obzira na dodane antibiotske poticatelje rasta u hranu, smatramo da bi bilo, zbog zdravlja i dobrobiti svinja, te gospodarstvenih (uzgajivači svinja i proizvođači stočne hrane) i zdravstvenih razloga (konzumenti), nužno utvrditi prirodne alternativne dodatke hrani i to radi prilagodbe na zabranu nekliničke uporabe antibiotskih poticatelja rasta u hrani (u EU od 2006. godine), odnosno na skoro povlačenje antibiotskih poticatelja rasta u proizvodnji životinja namijenjenih ljudskoj prehrani i u Hrvatskoj kao članici EU od 01.07.2013. Slijedom navedenoga hipoteza našeg istraživanja je da se:

- među odabranim prirodnim tvarima (propolis ili pripravak plemenite pečurke *in vivo*, te β-glukan *in vitro*) testiranim u planiranim pokusima, utvrditi najdjelotvornija zamjena antibiotskim poticateljima rasta u poticanju sustavnog imunosnog odgovora, a napose zaštitnog crijevnog mukoznog imunosnog odgovora, uz optimalno funkcioniranje probave, stabilizaciju crijevnih mikrobiota, te normalne pokazatelje općeg zdravstvenog stanja odbijene prasadi.
- odabrani najučinkovitiji alternativni dodatak hrani za odbijenu prasad uvede u intenzivne uzgojne sustave za proizvodnju svinja, koji bi funkcionirali bez dodavanja antibiotskih poticatelja rasta u hranu, te time postali neškodljivi po konzumente i okoliš, kao i po dobrobit odbijene prasadi.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Tehnologijski uvjeti na farmi

Istraživanje smo proveli na svinjogojskoj farmi OPG Zdravko Škare, Polonje, Sveti Ivan Zelina. Specifičnost farme je da se prasilište i odgajalište nalazi u jednom objektu (Slika 1.) dok je tovilište zasebni, potpuno automatizirani objekt udaljen 1 km od odgajališta. Pokus smo obavljali u prostoriji u sklopu odgajališta koja se sastojala od 10 zasebnih odjeljaka za odbijenu prasad. Boksevi su opremljeni polurešetkastim plastičnim podom ispod kojeg se nalazi kanal za skupljenje gnoja. Prasad smo hranili standarnom krmnom smjesom za odbijenu prasad iz podnih valova. Svaki je boks bio opremljen automatskom pojilicom smješten 20 cm od poda. Prostorija je grijana plinskom grijalicom. S vanjskog zida sobe dopire prirodno svjetlo kroz 4 vodoravna prozora. Umjetna rasvjeta sastoji se od 6 rasvjetnih tijela smještenih po sredini objekta. Naseljavanje odgajališta odvija se po principu sve unutra-sve van. Između pojedinih ciklusa pražnjenja i punjenja odgajalište se čisti i dezinficira.



Slika 1. Svinjogojska farma OPG Zdravko Škarec, Polonje, Sveti Ivan Zelina (prasilište i odgajalište).

4.1.2. Pokusna prasad

U pokusu smo koristili ukupno 90 križane prasadi (Švedski Landrace x Yorkshire), ženke i kastrati, ujednačene mase oko 7 kg, u dobi od 28. do 56. dana života, držane podno u odgajalištu u uvjetima intenzivnog uzgoja i hranjene standardnim krmnim smjesama ST-1 i ST-2 (Slika 2). Prasad smo razvrstali u 3 skupine sa po 30 jedinki u svakoj. Skupine smo držali odvojeno, ali u istom objektu. Prasad u skupini A hranili smo standardnom krmnom smjesom SKS). Prasad u skupini B hranili smo standardnom krmnom smjesom uz dodadat pripravka plemenite pečurke (PPP) u koncentraciji od 1%. Prasad u skupini C hranili smo standardnom krmnom smjesom uz dodadat nativnog propolisa (NP) u koncentraciji od 0,1. Tijekom cijelog pokusa prasadi su hrana i voda bili dostupni *ad libitum*.



Slika 2. Odjeljak s pokusnom prasadi.

4.1.3. Pokusni pripravci

U pokusu smo koristili slijedeće biološke pripravke:

1. pripravak plemenite pečurke (*Agaricus bisporus*) iz komercijalnog uzgoja tvrtke GEA d.o.o. Zagreba (Slika 3).

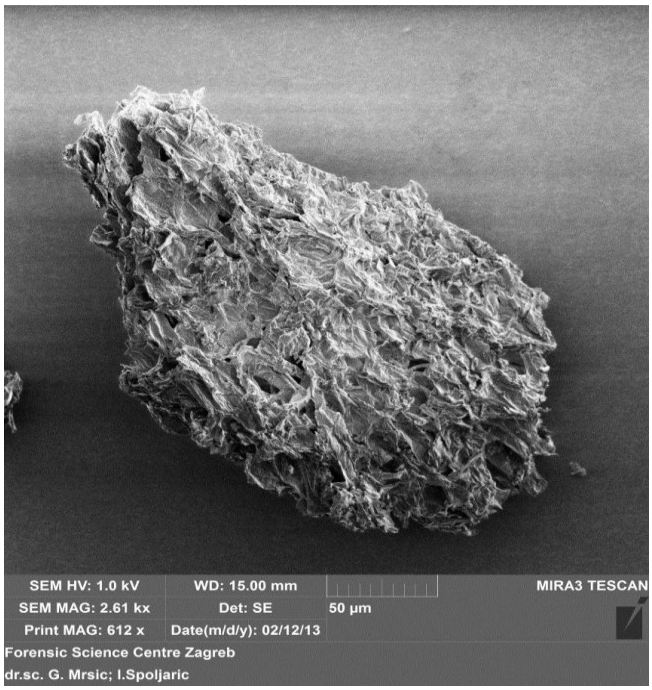
S

Slika 3. Komercijalni uzgoj plemenite pečurke tvrtke GEA d.o.o.

Svježe, netom ubrane plemenite pečurke, nakon što smo uzeli uzorke za analitičke i mikrobiološke analize, sušili smo u sušari 6 sati na 42°C. Osušene plemenite pečurke samljeli smo u prah te njihov uzorak uzeli za analitičku i mikrobiološku analizu. Potom smo suhe plemenite pečurke u prahu umiješali u komercijalnu hranu za odbijenu prasad u koncentraciju od 1% (Slika 4-5).



Slika 4. Uzorak suhe biomase u prahu plemenite pečurke



Slika 5. Elektronskim mikroskopom SEM-u Tescan Mira3 FEG vizualizirana ultrastruktura suhe biomase u prahu plemenite pečurke (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

2. nativni propolis proizvođača OPG Špoljarić , Zagreb (Slika 6.).



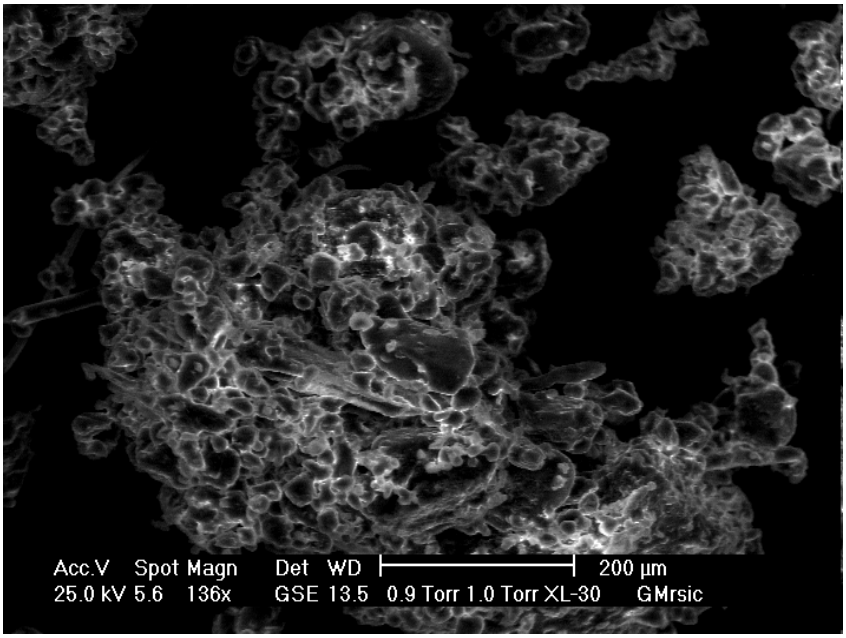
Slika 6. Pčelinje košnice OPG Špoljarić

Propolis smo uzeli iz košnica sa područja Ivanić Grada. Nakon oduzimanja, hladili smo ga jedan sat na -20˚C, te smo ga potom usitnili. Nakon što smo uzorak nativnog propolisa

uzeli za analitičku analizu umješali smo ga u komercijalnu hranu za odbijenu prasad u koncentraciji od 0,1% (Slika 7-8).



Slika 7. Uzorak suhe biomase u prahu nativnog propolisa

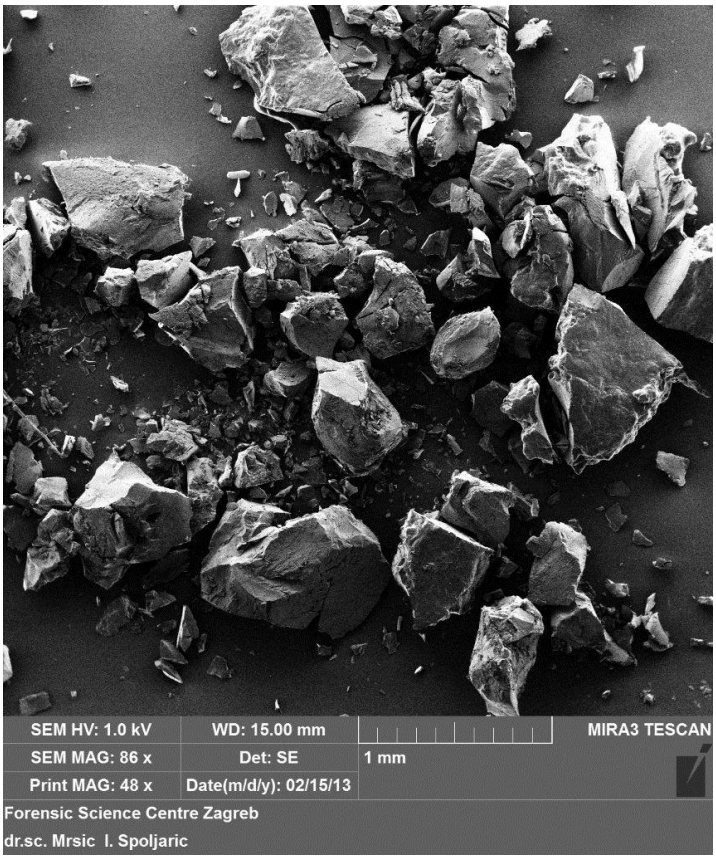


Slika 8. Elektronskim mikroskopom SEM-u Tescan Mira3 FEG vizualizirana ultrastruktura suhe biomase u prahu nativnog propolisa (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

3. komercijalni pripravak β-glukana u obliku topivog praška (broj formule F3020, broj proizvoda 08231-01) izdvojenog iz ne-GMO soja pekarskog kvasca *S. cerevisiae* proizvođača Biothera (Eagan, MN, SAD). Pripravak smo koristili za određivanje stupnja fagocitoze i mikrobicidnosti monocita i granulocita u *in vitro* uvjetima (Slika 9-10).



Slika 9. Uzorak suhe biomase β-glukana u obliku topivog praška (broj formule F3020, broj proizvoda 08231-01) izdvojenog iz ne-GMO soja pekarskog kvasca *S. cerevisiae* proizvođača Biothera (Eagan, MN, SAD).



Slika 10. Elektronskim mikroskopom SEM-u Tescan Mira3 FEG vizualizirana ultrastruktura suhe biomase β-glukana u obliku topivog praška (broj formule F3020, broj proizvoda 08231-01) izdvojenog iz ne-GMO soja pekarskog kvasca *S. cerevisiae* proizvođača Biothera (Eagan, MN, SAD). (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

4.1.4. Analitičke metode

Nativni propolis i pripravak plemenite pečurke analizirali smo metodom vezanog sustava plinske kromatografije - spektrometrija masa (GC-MS, Perkin Elmer, SAD) (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska). Koristili smo kolonu „Agilent 19091S 433, 350 °C Max, HP 5 MS, 0,25 mm x 30 m x 0,25 um“. Kao plin nosilac koristili smo helij. Protok plina nosioca bio je 0,94 mL/min. Početna temperatura GC-a bila je 80°C (sa zadrškom od 2 minute), te se zatim penjala do 300 °C brzinom od 25 °C/min, te je na 300 °C zadrška iznosila 5,20 minuta. Ukupno vrijeme analize iznosilo je 16 minuta. Način rada injektora bio je splitless, temperatura injektora iznosila je 275°C, dok je vrijeme uzorkovanja iznosilo 0,5 minuta. Temperatura ionskog izvora iznosila je 275 °C, a MS kvadrupola 150 °C, dok je način prikupljanja podataka bio scan. Uzorak za GC-MS

analizu smo pripremili tako da smo u 0,5 mL propolisa/pripravka plemenite pečurke dodali 0,2 mL NaOH i 0,5 mL diklormetana. Potom smo ekstrakte diklormetana prenijeli u bočice za GC-MS.

Elementnu kemijsku analizu uzoraka nativnog propolisa i pripravka plemenite pečurke na prisustvo teških metale napravili smo na elektronskom mikroskopu SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom pomoću programskog paketa Genesis verzija 6.02, proizvođača Edax, i EDX detektora aktivne površine 10 mm2, proizvođača EDAX, model 135-10 PV9760/68 (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

4.1.4. Pokusne skupine i plan pokusa

Prasad smo, po odbiću, izvagali i odabrali 90 po težini ujednačene prasadi (uzevši u obzir samo podjednaku zastupljenost spolova) u 3 pokusne skupine (obilježenih od A-C**)** sa po 30 prasadi u svakoj. Prasad u skupini A hranili smo standardnom krmnom smjesom (SKS). Prasad u skupini B hranili smo standardnom krmnom smjesom uz dodadat pripravka plemenite pečurke (PPP) u koncentraciji od 1%. Prasad u skupini C hranili smo standardnom krmnom smjesom uz dodadat nativnog propolisa (NP) u koncentraciji od 0,1. Označili smo ih ušnima markicama, i držali u odvojenim odjeljcima odgajališta farme. Pokus je trajao 28 dana (do 56. dana života), a tijekom toga razdoblja pratili smo dnevno ili u sedmodnevnim razmacima skupine pokazatelja prikazanih u Tablici 2.

Tablica 2. Plan *in vivo*/*ex vivo* pokusa za testiranje imunmodulacijskih i nutritivnih osobitosti pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa

Skupina (br. prasadi)	**P O K A Z A T E LJ I**					
	Zdravstveni i proizvodni	**Imunologija, hematologija i serumska biokemija**	**Bakteriologija (BAK), analiza hrane (AH) i ambijentalni uvjeti (AU)**		**Histopatologija (HP), elektronska mikroskopija, analiza mesa (AM) i BAK****	
	M..E T O D E/ U Z O R C I (dan pokusa)					
	OZS, PDP, PDUH, KH, SD **(0., 14., 21. i 28.)**	PK/S (puna krv/serum)* **(0., 14., 21. i 28.)**	BAK (RO) **(0., 14., 21. i 28.)**	AH, AU **(0. i 28.)**	HP (TC, MLČ i ...)/ BAK (CFU), AM **(0. i 28.)**	IHM (J, I i MLČ) **(0. i 28.)**
KONTROLA (A)	30	7/30*	7/30*	30	2 + 1	
Plemenita pečurka (B)	30	7/30	7/30	30	0 + 1	
Nativni propolis (C)	30	7/30	7/30	30	0 + 1	
UKUPNO:	90	21/90	21/90	90	2 + 3 = 5	

**Uzorci PK i RO samo od prasadi 1-7 označene ušnim brojevima; **Žrtvuju se po 2 praseta iz kontrolne skupine 0. dana pokusa, te 1 prase po skupini 28.dana pokusa (ukupno 5 prasadi) radi post mortem pretraga (HP, IHM, BAK/ CFU/ml i AM).*

Pokazatelji koje smo pratili (od 0. do 28. dana pokusa ili od 28. do 56. dana života) su:

- Zdravstveni i proizvodni (koji uključuju: OZS, PDP, PDUH, KH i SD) - praćenje u sedmodnevnim razmacima (0., 7., 14., 21. i 28. dan);
- Imunološki, hematološki i serumsko biokemijski (iz uzoraka pune krvi=PK i seruma = S) - praćenje u sedmodnevnim razmacima (0., 7., 14., 21. i 28. dan)*;
- Bakteriološki (BAK), analiza hrane (AH) i ambijentalni uvjeti (AU) iz uzoraka za BAK (RO) – praćenje u sedmodnevnim razmacima (0., 7., 14., 21. i 28. dan)*, dok ćemo AH** i AU provesti 0. i 28. dana pokusa;
- Histopatološki (HP), elektronska mikroskopija, analiza mesa (AM) i BAK*** - praćenje HP (TĆ, MLč i...), BAK (CFU), AM i IHM (J, I i MLČ) 0. i 28. dana pokusa

4.1.5. Monoklonska, poliklonska protutijela i konjugati

Za citometrijska istraživanja subpopulacija leukocita periferne krvi koristili smo monoklonska protutijela (mPt) tvrtki Abcam, Cambridge, UK i AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK (Tablica 3). Mišja monoklonska protutijela su bila konjugirana s fluorescentnim bojama fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili fikoeritrinom (Pe).

Tablica 3. Mišja monoklonska protutijela (mPt) specifična za svinjske leukocitne CD molekularne biljege i konjugati korišteni za citometrijsku imunofenotipizaciju leukocita periferne krvi odbijene prasadi.

mPt specifična za molekularni biljeg	**Izotip**	**Oznaka klona**	**Konjugat**	**Stanična specifičnost**	**Izvor**
CD4	IgG2b	74-12-4	Pe/Cy5®	Subpopulacija pomoćničkih T-limfocita (T_h)	Abcam
CD8a	IgG2a	76-2-11	Fikoeritrin	Subpopulacija citolitičkih T-stanica (T_c)	
CD45	IgG1	K252-1E4	FITC	Leukociti	AbD Serotec
CD21	IgG1	BB6-11C9.6	FITC	B-limfociti	Abcam

4.2. Metode

4.2.1. „*In vivo*“ primjena pokusnih pripravaka

Prasad kontrolne skupine A hranili smo standarnom krmnom smjesom za odbijenu prasad bez ikakvih dodataka. Prasadi pokusne skupine B umješali smo 1% pripravka plemenite pečurke u standarnu krmnu smjesu za odbijenu prasad od 0. – 28. dana pokusa Prasadi pokusne skupine C umješali smo 0,1% pripravka nativnog propolisa u standarnu krmnu smjesu za odbijenu prasad od 0. – 28. dana pokusa.

4.2.3. „*In vitro*“ primjena pokusnih pripravaka

U *in vitro* uvjetima za analizu stupanja fagocitoze (ingestije) i mikrobicidnosti (digestije) monocita i granulocita u kulturu stanica dodali smo 0,1 % β-glukana u obliku topivog praška (broj formule F3020, broj proizvoda 08231-01) izdvojenog iz ne-GMO soja pekarskog kvasca *S. cerevisiae* proizvođača Biothera (Eagan, MN, SAD).

4.2.3. Praćenje proizvodnih pokazatelja

Prasad smo vagali tijekom pokusa u tjednim razmacima i bilježili promjene u tjelesnoj masi. Promjene u tjelesnoj masi po pokusnim skupinama izračunavali smo temeljem odstupanja od težine na početku pokusa (0. dan = 100% tjelesne mase), odnosno temeljem odstupanja od prosječne težine u pojedinoj skupini po danima pokusa (0.,14., 21., 28.) u usporedbi s prosječnom težinom prasadi iz kontrolne skupine istoga dana pokusa.

4.2.4. Praćenje zdravstvenih pokazatelja

Prasad smo svakodnevno kontrolirali od 0. do 28. dana pokusa, radi praćenja pojave proljeva ili drugih kliničkih znakova koji bi upućivali na pojavu bolesti. Jačinu proljeva iskazali smo na osnovi stupnjeva: 0 = normalni izmet, 1 = mekani izmet, 2 = tekući izmet i 3 = profuzni proljev. Osim morbiditeta, pratili smo i mortalitet prasadi tijekom pokusa. Pri prosuđivanju zdravstvenog stanja pokusne prasadi koristili smo, uz spomenute, hematološke i biokemijske podatke.

4.2.5. Uzimanje uzoraka

Svu smo prasad izvagali prije početka tretiranja pokusnim pripravcima (0. dan), a potom smo ih svakih 7 dana tijekom 5 tjedna trajanja pokusa do 28. dana pokusa). U istim vremenskim razmacima (0., 14., 21., 28. dan pokusa) uzimali smo uzorke krvi i obriske rektalne sluznice, a neposredno nakon žrtvovanja (0. i 28. dan) uzimali smo uzorke sadržaja crijeva (jejunuma), te mezenterijskog limfnog čvora za bakteriološku, patohistološku pretragu i elektronsku mikroskopiju.

4.2.4.1. Periferna krv

Uzimali smo uzorke (ukupno 3 mL) krvi iz *vene cava cranialis* u staklene epruvete s podtlakom (Venosafe, Terumo, EU) s dinatrijevom soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA, Sigma) (1 mL) ili heparinom (1,5 mL) kao antikoagulansom (za protočnu citometriju/hematologiju, odnosno fagocitozu/mikrobicidnost), te bez antikoagulansa s gelom i Clot Act. (3,5 mL) radi odvajanja seruma za serumsku biokemiju (Venosafe, Terumo, EU). Prilikom svakog uzimanje krvi od ukupno 30 životinja po skupini iz svake smo skupine uzimali krv od 7 posebno označenih životinja (krv je vađena svaki put istim životinjama) (Slika 11).



Slika 11. Uzorci periferne krvi i rektalnih briseva prasadi u pokusu.

4.2.4.2. Obrisci sluznice rektuma

Za bakteriološku pretragu sluznice rektuma obriske smo uzimali 0., 14., 21., i 28. dana pokusa i to od po 7 životinja iz svake skupine (istih 7 životinja kojima smo vadili perifernu krv) (Slika 12). Uzorke smo na farmi pohranili u prijenosni hladnjak te ih potom dostavili u Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI) u Zagrebu.



Slika 12. Uzorkovanje rektalnih briseva pokusnoj prasadi.

4.2.4.3. Sadržaj jejunuma i tkivo jejunuma, i mezenterijalni limfni čvorovi

0. i 28. dana pokusa, odabranu smo prasad eutanazirali intrakardijalnim uštrcavanjem 0,3 mL/kg tjelesne mase preparata T61 (Hoechst, Njemačka) u skladu sa Zakonom i propisima za poštivanje etike o dobrobiti životinja Republike Hrvatske i europskim dokumentom o držanju i rukovanju sa laboratorijskim životinjama: "Directive for the Pritection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Purposes" (86/609/EEC).

Nakon razudbe eutanazirane prasadi uzeli smo slijedeće uzorke:

- odrezak jejunuma sa sadržajem za određivanje broja bakterijskih stanica (10 cm duljine, podvezan kirurškim koncem na svakom okrajku);
- za patohistološku pretragu uzeli smo uzorke tkiva jejunuma, mezenterijalni limfni čvor u 10 %-tnoj otopini paraformaldehida u fosfatnom puferu (pH 7,2).

4.2.6. Određivanje imunosnih pokazatelja

Imunosne pokazatelje određivali smo postupkom imunofenotipizacije i kvantifikacije svinjskih CD+ subpopulacija T- i B-limfocita, te ukupnih leukocita periferne krvi pomoću protočnog citometra Coulter EPICS-XL.
Također smo procjenjivali sposobnost fagocitoze i mikrobicidnosti granulocita i monocita periferne krvi (β-glukan *in vitro*), te opći imunosni status temeljem brojnosti i udjela pojedinih populacija leukocita u krvi i imunoglobulina u serumu.

4.2.5.1. Protočna citometrija (metoda modificirana POPOVIĆ i VALPOTIĆ, 2004.)

Udjel subpopulacija leukocita periferne krvi pokusne prasadi određivali smo obilježavanjem staničnih membranskih biljega monoklonskim protutijelima protiv svinjskih CD antigena s pomoću protočne citometrije prema opisanom postupku POPOVIĆ i VALPOTIĆ (2004). Uzorke periferne krvi (100 μL) do obrade smo pohranili na 4˚C, a zatim razrijedili fosfatnim puferom (PBS; pH 7,4 – 7,6) i podesili broj leukocita na 2 $x10^6$/L. Suspenziji leukocita dodali smo 50 μL mPt specifičnog za pojedinu istraživanu subpopulaciju svinjskih CD+ stanica (Tablica 2) i inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Nakon inkubacije, stanice smo isprali u 2 mL PBS-a centrifugiranjem tijekom 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Dobiveni smo supernatant odlili, te smo na talog dodali 50 μL kunićji antimišji konjugat konjugiranog s fluorescentnim bojama (FITC ili fikoeritrin) i inkubirali tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim smo stanice isprali u 2 mL PBS-a centrifugiranjem 5 minuta na 2000 okretaja/minuti, talogu dodali 2 mL lizirajućeg reagensa (amonijevog klorida, NH4Cl, pH 7,3), i inkubirali u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Supernatant smo odlili, a na talog dodali 1 mL PBS-a, te u tako pripremljenim suspenzijama obilježenih leukocita određivali udjele imunofenotipova svinjskih CD+ stanica pomoću protočnog citometra Coulter EPICS-XL (Coulter, SAD). Uzorke leukocita periferne krvi pripremili smo u triplikatu, a u svakom je triplikatu analizirano po 10 000 stanica.

4.2.5.2. Fagocitoza i mikrobicidnost (metoda modificirana po LUKAČ i sur., 1994.)

Odredili smo stupanj fagocitoze (ingestije) i mikrobicidnosti (digestije) monocita i granulocita periferne krvi u *in vitro* postupcima prema opisanom postupku LUKAČ i sur. (1994.). Iz uzorka periferne krvi (uz dodatak natrijevog heparina) istaložili smo eritrocite i odvojili

plazmu, a sloj stanica iz plazme izdvojili i isprali tri puta Medijem 199 (MEM, Imunološki zavod, Zagreb), te podesili njihov broj na 1 x 106 /mL. Suspenziju stanica smo razdijelili u male komorice (0,25 mL) promjera 1,5 cm i inkubirali pri 370 C u zraku sa 5% CO2 tijekom 30 min. Potom smo odlili supernatant, a stanice koje se nisu prihvatile za stjenke komorice pomno smo isprali MEM-om zagrijanim na 370 C. U komoricu u kojoj su ostali adherirani fagociti dodali smo 0,25 mL suspenzije sa 40 x 106/mL živih stanica (najmanje 99%) kvaščeve gljivice Saccharomyces cerevisiae, te ponovno inkubirali 30 min. Komoricu smo potom isprali, a stanice obojili 0,05% narančastim akridinom (Sigma, St. Louis, SAD) u MEM-u tijekom 1 min. MEM smo isprali, komoricu pokrili pokrovnicom, te mikroskopirali fluorescentnim mikroskopom pri povećanju od 800x. Prebrojali smo najmanje po 100 granulocita i monocita sa fagocitiranim gljivicama. Rezultate fagocitoze iskazali smo kao postotak stanica koje su fagocitirale, pri čemu je postotak fagocitne aktivnosti = broju stanica koje su fagocitirale/ukupan broj stanica x 100, odnosno kao indeks ingestije (ii), pri čemu je ii = broj fagocitiranih gljivica/ broj fagocita. Sposobnost unutarstaničnog ubijanja gljivica (mikrobicidnost) određivali smo temeljem razlikovanja mrtvih (crveno obojanih) i živih (zelenih) fagocitiranih gljivica, a iskazali smo je u postotnim vrijednostima, pri čemu je % mikrobicidnosti = broj fagocitiranih mrtvih gljivica/broj ukupno fagocitiranih gljivica x 100.

4.2.7. Određivanje hematoloških pokazatelja

Hematološke pokazatelje (broj eritrocita i trombocita, razinu hemoglobina i hematokrit) određivali smo u uzorcima periferne krvi s EDTA kao antikoagulansom, standardnim metodama pomoću automatskog elektronskog brojača Serono Baker System 9120 (Pennsylvania, SAD). Brojnost leukocita smo određivali pomoću automatskog elektronskog brojača Serono Baker System 9120 (Pennsylvania, SAD), a diferencijalnu krvnu sliku načinili smo iz razmaza periferne krvi obojanih po May Grűnwald-Giemsi. Udjele pojedinih populacija leukocita odredili smo pregledom krvnog razmaza mikroskopom Olympus BX 41 na imerznom povećanju.

4.2.8. Određivanje serumskih biokemijskih pokazatelja

Ukupne serumske proteine, albumine, jetrene enzime (alkalna fosfataza = ALP, aspartat aminotransferaza = AST, alanin aminotransferaza = ALT, gama glutamil transferaza = GGT) te glukozu, ureu, kolesterol i trigliceride određivali smo standardnim metodama pomoću automatskog analizatora Olympus AU 600 (Hamburg, Njemačka), a dobivene vrijednosti vrednovali usporedbom s referentnim vrijednostima a za domaću svinju.

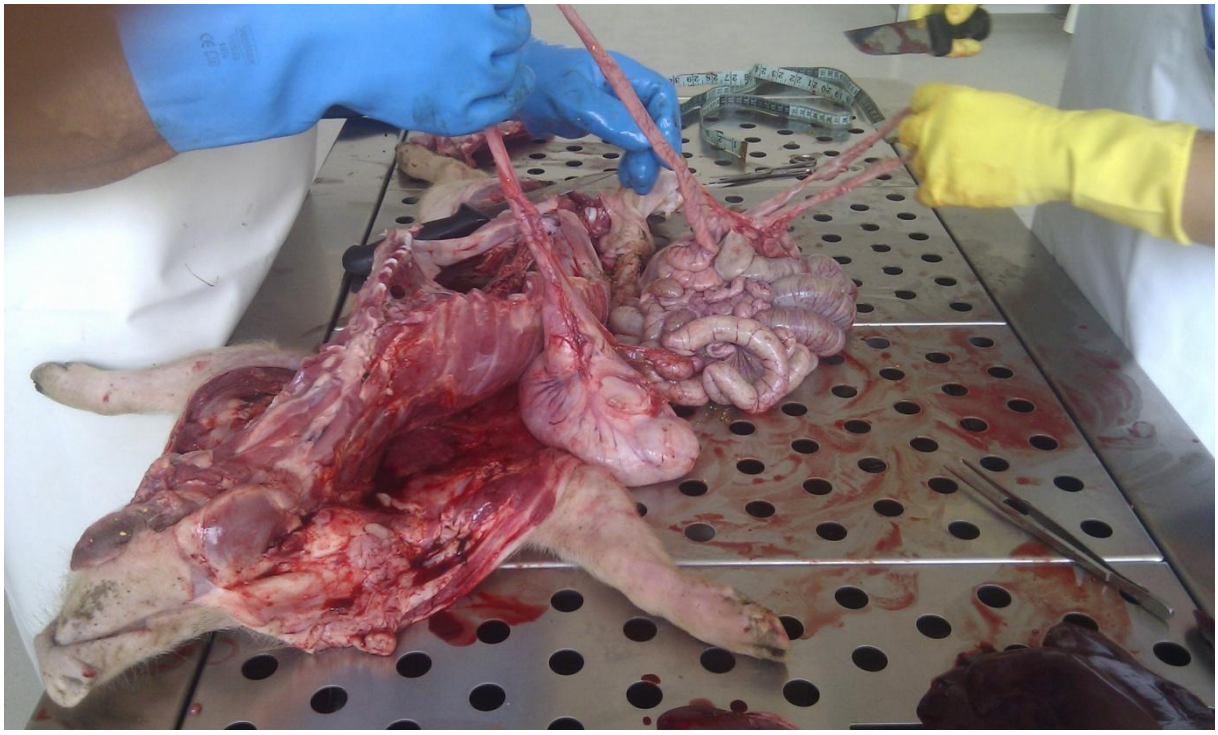
4.2.9. Bakteriološka pretraga

Ukupan broj stanica bakterije *E. coli* u 1 mL sadržaja jejunuma (CFU/mL) odredili smo standardnim postupkom dvostrukih serijskih razrjeđenja sadržaja jejunuma od 10^1 do 10^{10} u fiziološkoj otopini. Ovako pripremljena razrijeđenja smo nacjepljivali na neselektivne bakteriološke podloge (WINN i sur., 2006.). Od svakog razrjeđenja ulili smo 1 mL u Petrijeve zdjelice i naslojili na podlogu s fenolnim crvenilom (XLD podloga; GIBCO BRL; M56000). Sposobnost tvorbe hemolizina izdvojenih sojeva, istražili smo nacjepljivanjem 0,1 mL sadržaja jejunuma na krutu bakteriološku podlogu kojoj je dodano 5% ovčje krvi i eskulin (Blood Agar Base, No. 2, OXOID CM 271). Svako serijsko razrjeđenje nacjepili smo na dvije ploče hranjive podloge, a nakon inkubacije pri 37º C tijekom 24 sata izbrojali smo porasle kolonije. Srednje vrijednosti ukupnog broja poraslih kolonija istog uzorka nacijepljenog na dvije ploče označavana je CFU/mL određenog bakterijskog izolata. Bakteriološkom pretragom na selektivnim hranjivim podlogama izdvojili smo vrste bakterije *E. coli*, a po pet pojedinačnih kolonija bakterije *E. coli* sa svake ploče, naknadno smo umnožili radi određivanja serološke pripadnosti antigena brzom aglutinacijom na predmetnom stakalcu pomoću kunićjeg antiseruma priređenim od standardnih sojeva bakterije *E. coli* (Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Danska). Obriske sluznice rektuma obradili smo kao i sadržaj crijeva.

4.2.10. Histopatološka pretraga

Patoanatomsku pretragu žrtvovanih prasadi napravili smo na Zavodu za patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pregledali smo lešine žrtvovane prasadi (Slika 13.), te vodili protokol o nalazima. Tijekom razudbe uzimali smo uzorke tankoga crijeva i

mezenterijalnih limfnih čvorova za histopatološku analizu. Pripremljen histološke preparate analizirali smo pomoću svjetlosnim mikroskopom s fotografskim uređajem (LEITZ, Dialux 20EB).



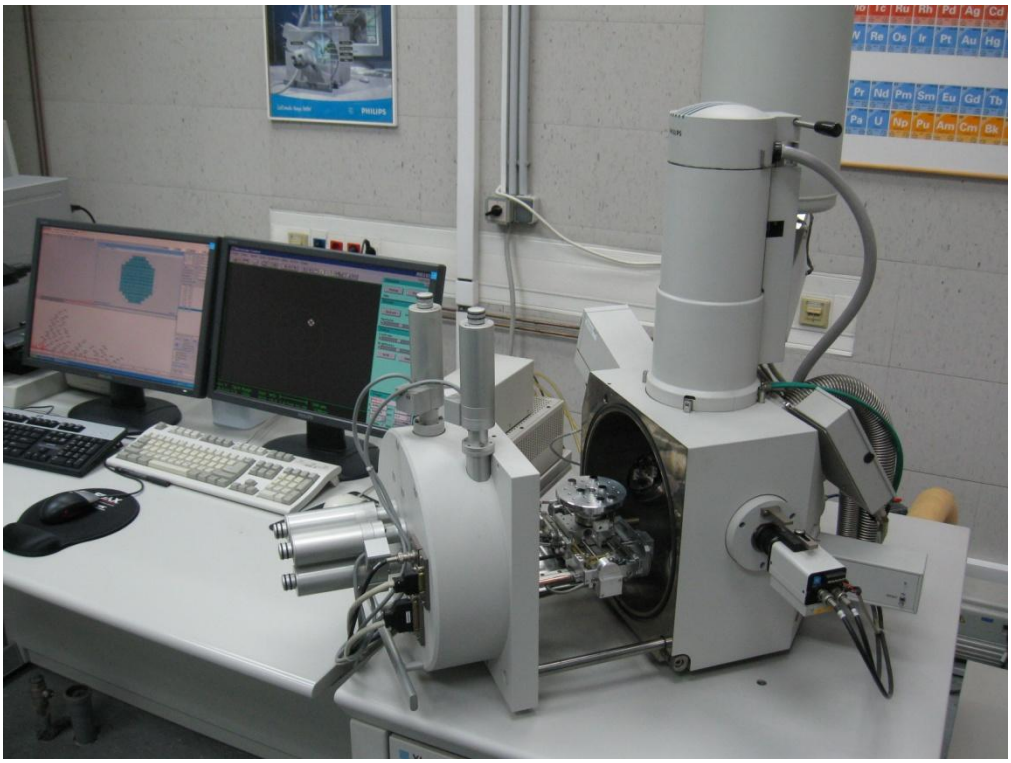
Slika 13. Razudba eutanazirane prasadi i uzimanje uzoraka.

Uzorke jejunuma i mezenterijalnih limfnih čvorova fiksirali smo u 10%-tnom puferiranom paraformaldehidu te ih dehidrirali uranjanjem u 70%, 96%-tni etanol (1 sat), a zatim u dvije izmijene 100 %-tnog etanola (1 sat). Nakon toga uzorke smo inkubirani preko noći u kloroformu pri 56ºC, a potom prenijeli u smjesu kloroforma i paraplasta (1:1) pri 56ºC (1 sat). Zatim smo uzorke uranjali u dvije izmijene paraplasta (paraplast I i paraplast II) tijekom 1 sata pri 56ºC. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi blokove smo rezali mikrotomom (Reichert-Jung, Njemačka) na rezove debljine 5-6 μm i ravnali na površini vodene kupelji zagrijane na 50ºC. Dio rezova smo pohranili za elektronsku mikroskopiju (elektronski mikroskop SEM Tescan Mira3 FEG), a dio za pripremu histoloških preparata. Za histološke preparate, izrezano tkivo zalijepili smo na predmetna stakalca prethodno premazana s 2% APES-om (3-aminopropil-trietoksilen, Sigma, St. Louis, SAD) u acetonu te ga deparafinirali uranjanjem u dvije izmijene ksilola (10 min.) i niz etanola padajuće koncentracije (5 min. u 100%, 96%, 80% i 70%-tnom etanolu). Nakon ispiranja u dvije izmijene destilirane vode (5 min.), rezove tkiva uronili smo u hemalaun (10 min.), isprali u tekućoj vodi te uronili u eozin (2 min.). Rezove smo zatim ponovo ispirali u dvije izmijene destilirane vode (5 min.),

dehidrirali u nizu etanola rastuće koncentracije (70%, 80%, 96%, 100%-tni etanol), prosvijetlili kraćim uranjanjem u ksilol, te uklopili u kanadski balzam. Nakon sušenja preparate smo histopatološki pretražili i snimili odabrana područja pojedinih preparata.

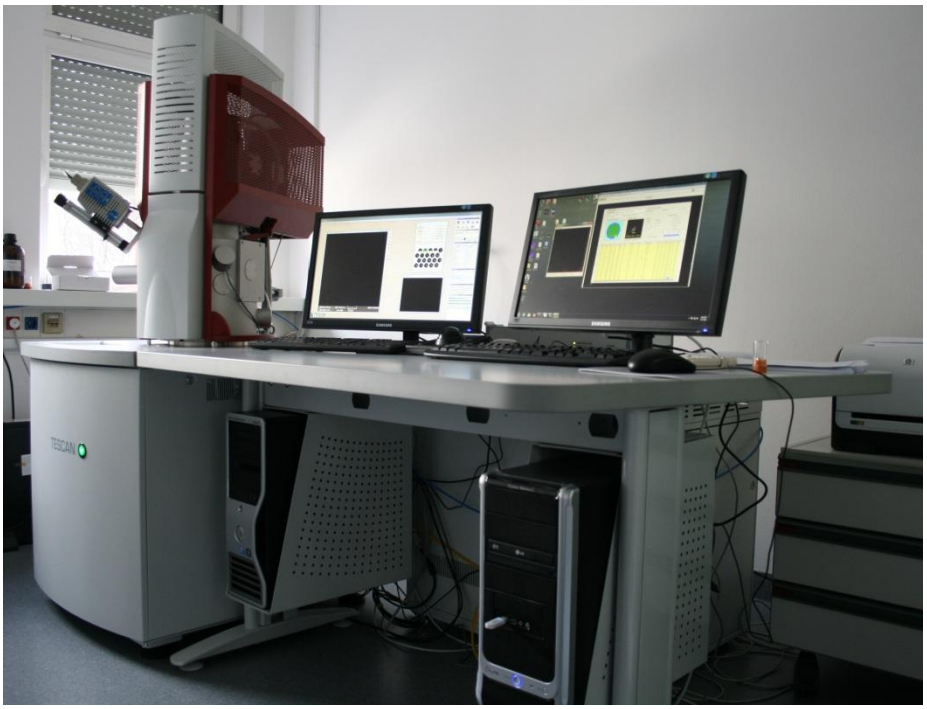
4.2.11. Metode elektronske mikroskopije

Za vizualizaciju ultrastrukture istraživanih pripravaka i njihovog elementarnog sastava (teških metala) koristili smo SEM/EDX metodu, odnosno skenirajući elektronski mikroskop (SEM) i energodisperzivni detektor X zraka (EDX). EDX analizu smo napravili pomoću programskog paketa Genesis verzija 6.02, proizvođača Edax, i EDX detektora aktivne površine 10mm2, proizvođača EDAX, model 135-10 PV9760/68 (Slika 14-15.).



Slika 14. Elektronski mikroskop tipa XL30 ESEM, Philips, Nizozemska (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

Za vizualizaciju ultrastruktura uzoraka tkiva prasadi tretiranih sa istraživanim pripravcima koristili smo elektronski mikroskop tipa SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom (Slika 15).



Slika 15. Elektronski mikroskop tipa SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

4.2.12. Statistička obrada

Statističku obradu prikupljenih podataka proveli smo primjenom programa JMP 7.0 (Business unit if SAS, SAS inc.). Grafički prikaz rezultata pokusa napravljen je u programo SAS 9.2 (SAS inc.). Za testiranje normalnosti distribucije podataka korišten je Kolmogorov-Smirnovim testom. Značajnost razlika između pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu prasadi, utvrdili smo koristeći analizu varijance (jednosmjerna ANOVA, Student t-test). Skupine za koje je p vrijednost iznosila $\leq 0,05$ smatrane su međusobno statistički značajno različite te su tako i obilježene na grafičkom prikazu rezultata.

5. REZULTATI

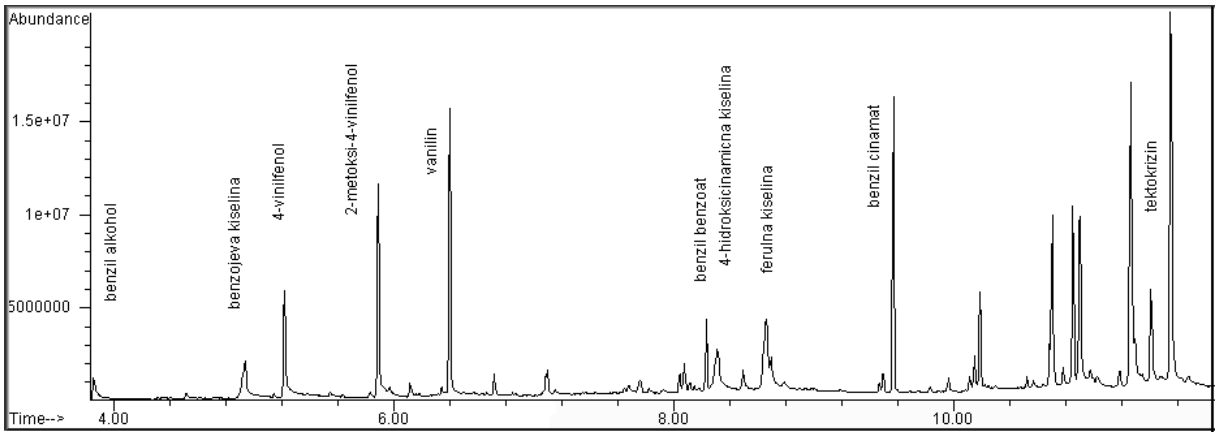
Dobivene podatke razvrstali smo kroz 10 skupina pokazatelja: analititika pokusnih pripravaka, proizvodni, zdravstveni, hematološki, imunosni, biokemijski, bakteriološki, histopatološki, kemijska analiza mesa, elektronska mikroskopija, mikroklimatski pokazatelji i kao takve ih prikazali u ovom poglavlju:

5.1. Analitički pokazatelji pokusnih pripravaka

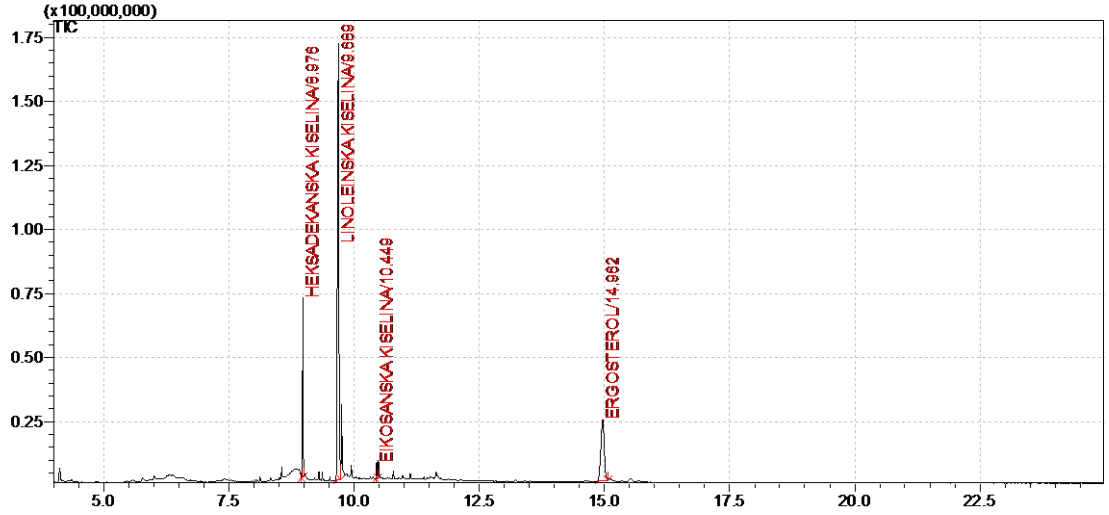
Metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS) u biološkim pokusnim pripravcima nismo utvrdili prisutvo toksičnih spojeva štetnih po zdravlje hranjenih prasadi (Tablica 4, Slika 16-17).

Tablica 4. GC-MS kvalitativna analiza pokusnih pripravaka.

GC-MS kvalitativna analiza	
Pripravak plemenite pečurke	Nativni propolis
• palmitinska kiselina • linoleinska kiselina • eikosanska kiselina • ergosterol	• benzil alkohol • benzojeva kiselina • 4-vinilfenol • 2-metoksi-4-vinilfenol • vanilin • benzil-benzoat • 4-hidroksicinamična kiselina • ferulna kiselina • tektokrizin



Slika 16. Histogramski prikaz GC-MS kvalitativne analize nativnog propolisa korištenog u pokusu (PCentar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).



Slika 17. Histogramski prikaz GC-MS kvalitativne analize pripravka plemenite pečurke korištenog u pokusu (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

Elementnom kemijskom analizom uzoraka nativnog propolisa i pripravka plemenite pečurke na prisustvo teških metale rađenoj na elektronskom mikroskopu SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom (EDAX), aktivne površine 10mm^2, nismo utvrdili njihovo prisustvo. U oba uzorka utvrdili smo samo u tragovima natrij, sumpor i kalcij (Slika 18-19).



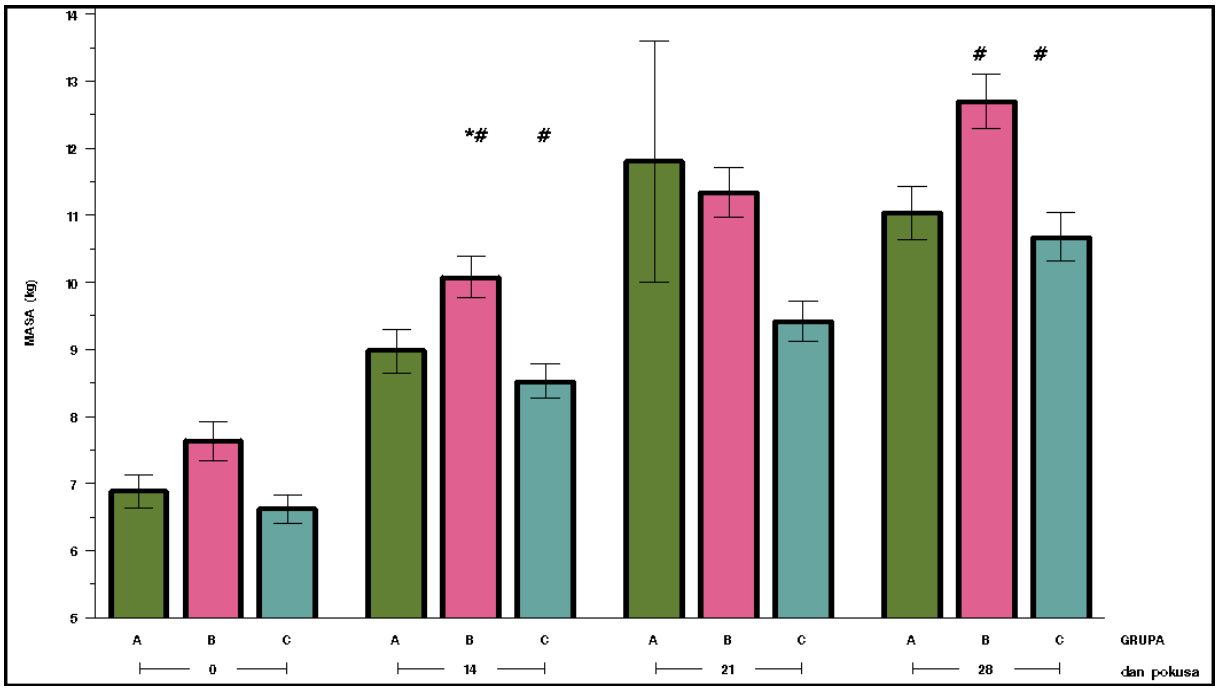
Slika 18 . Elementna kemijska analiza uzorka nativnog propolisa na prisustvo teških metale rađene na elektronskom mikroskopu SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom (EDAX), aktivne površine 10mm^2 (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).



Slika 19. Elementna kemijska analiza uzorka pripravka plemenite pečurke na prisustvo teških metale rađenej na elektronskom mikroskopu SEM-u Philips XL 30 s EDX detektorom (EDAX), aktivne površine 10mm^2 (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

5.2. Proizvodni pokazatelji

Promjena tjelesne mase pokusne prasadi u istraživanom razdoblju prikazana je na Slici 8. Statističke značajnosti su uočene 14. dana pokusa (za 10 % više B skupina u odnosu na A skupinu, te za 15% više B skupina u odnosu na C skupinu). Također i 28. dana pokusa nalazimo statističke značajnosti među skupinama B i C (za 16% više B skupina u odnosu na C skupinu). Najveću prosječne završnu masu u pokusa ostvarila je skupina B (za 12% više B skupina u odnosu na C skupinu). Pokusana skupina C ostvarila je manju prosječnu završnu masu na kraju pokusa u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 5% više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 18).



Slika 18. Promjena tjelesne mase u odbijene prasadi tretiranih (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom u hrani) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$)

5.3. Zdravstveni pokazatelji

Broj uginuća i učestalost proljeva u pokusne prasadi tijekom 5 tjedana trajanja pokusa, prikazani su u Tablici 5. Prasad iz kontrolne skupine imala je učestalost proljeva (6/30), dok je prasad skupine B i C imala vrlo nisku pojavnost proljeva. Od 30 prasadi iz kontrolne

skupine u 6 prasadi smo zabilježili proljev od kojih je dvoje prasadi imalo mekani izmet, dvoje tekući izmet, a dvoje profuzni proljev. Prasad iz kontrolne skupine kod kojih smo zabilježili profuzni proljev tijekom pokusa je uginula. U četiri praseta iz skupine B kod kojih smo uočili proljev jedno prase je imalo mekani izmet, dok smo kod tri ostala praseta, zabilježili tekući izmet. U ovoj skupini nismo zabilježili uginuća prasadi. Iz skupine C tijekom pokusa uginulo je dvoje prasadi kod kojih smo zabilježili izmet tekuće konzistencije (Tablica 5).

Tablica 5. Pojavnost proljeva, jačina proljeva, te uginuća u odbijene prasadi tretiranih gljivama i propolisom tijekom 5 tjedana trajanja pokusa.

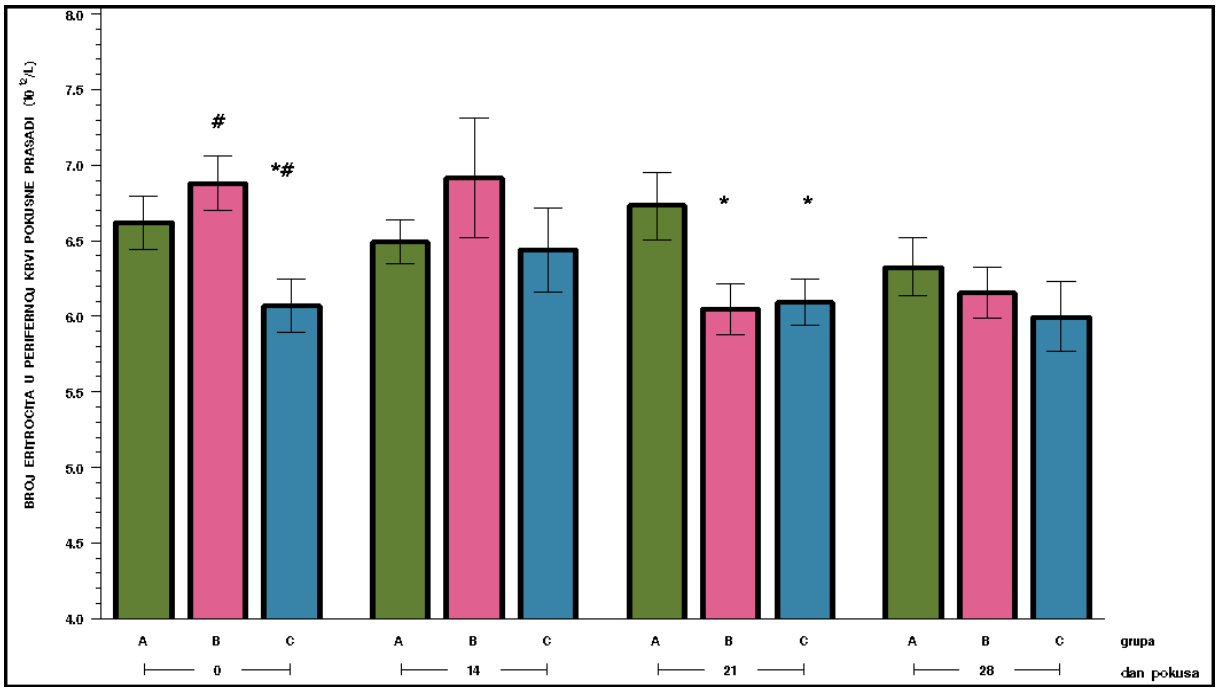
Način imunizacije prasadi (oznaka)*	**Broj prasadi s proljevom/ ukupno prasadi**	**Broj uginule prasadi/prasadi ukupno**
KONTROLA (A)	6/30	1/30
GLJIVE (B)	4/30	0/30
PROPOLIS (C)	2/30	2/30

* Svaka se skupina sastojala od 30 životinja.

5.4. Hematološki pokazatelji

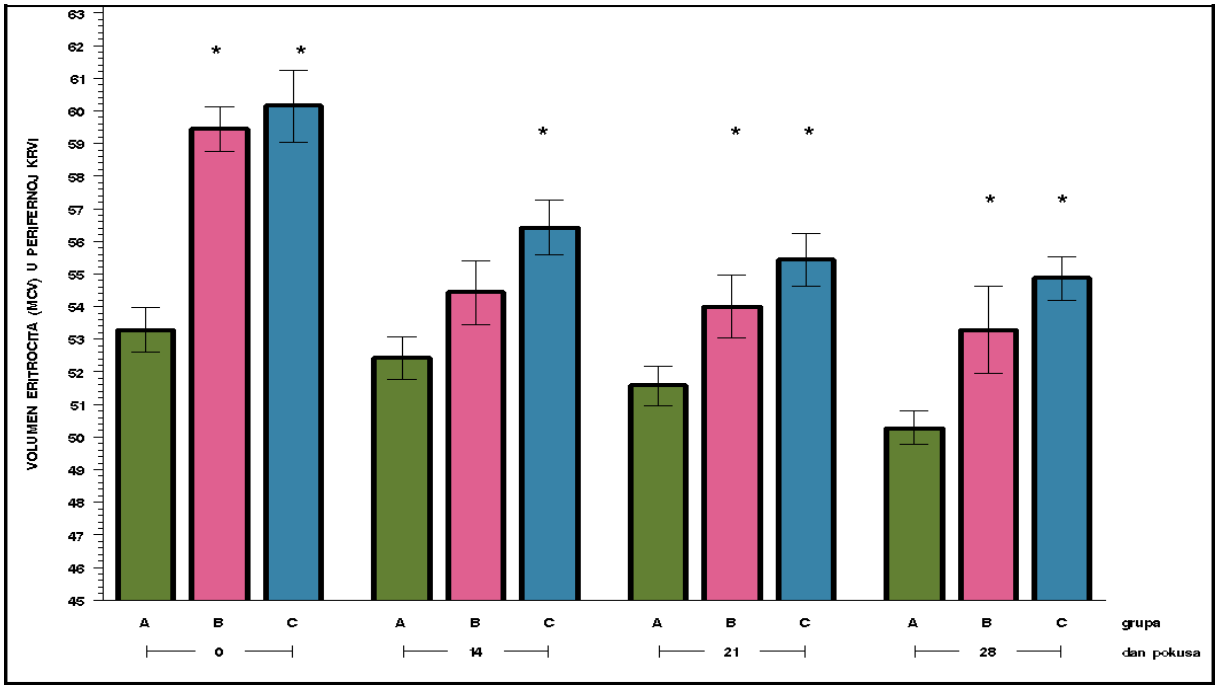
Niti jedan od istraživanih pripravaka (pripravak plemenite pečurke, propolis) nije prouzročio značajan utjecaj na fiziološke vrijednosti hemograma pokusne prasadi tijekom 5 tjedana trajanja pokusa, naime sve dobivene vrijednosti nalaze se unutar fizioloških granica za prasad starosti od 28 do 56 dana.

Tijekom pokusnog razdoblje statističku značajnost u broju eritrocita zabilježili smo 0. dana pokusa i to među grupama A i C (za 10 % više A skupina u odnosu na C skupinu), te međusobno među grupama B i C (za 12 % više B skupina u odnosu na C skupinu). Nadalje 28. dana pokusa zabilježene je statistička značajnost u broju eritrocita među skupinama A i B te A i C (za 4 % više A skupina u odnosu na B skupinu, (za 7 % više A skupina u odnosu na C skupinu)) (Slika 19).



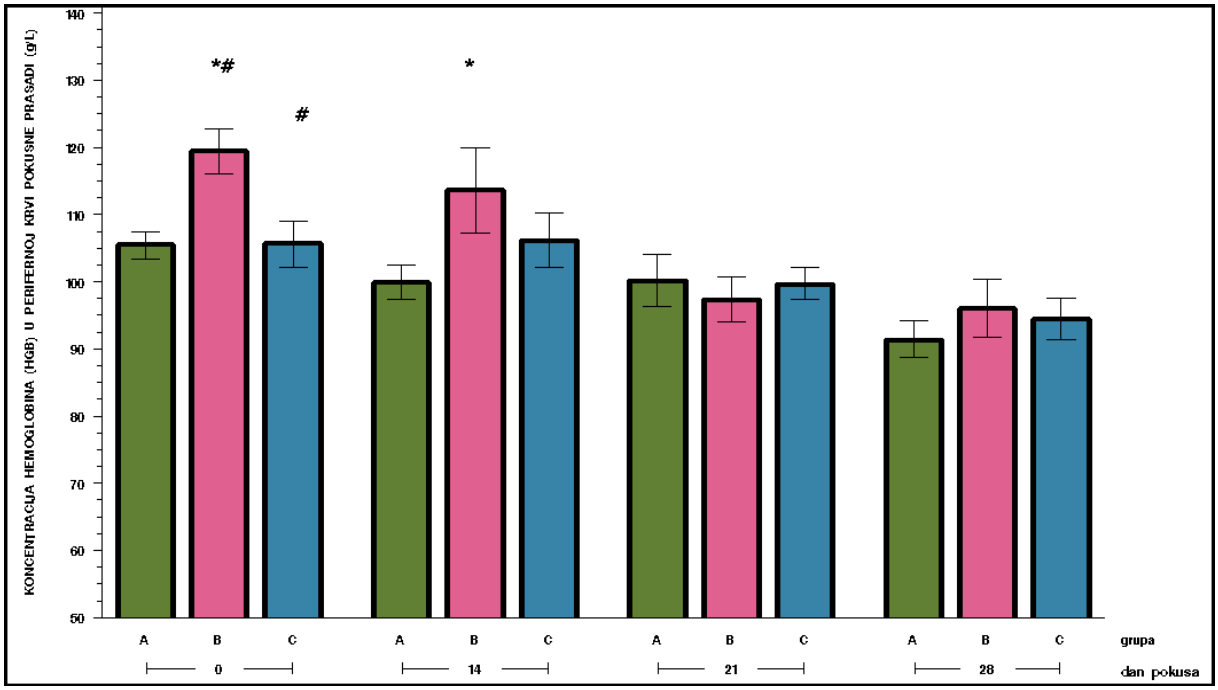
Slika 19. Brojnost eritrocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Kod vrijednosti prosječnog volumena eritrocita u perifernoj krvi pokusne prasadi statističke značajnosti su zabilježene 0. dana pokusa među pokusnim skupinama B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 11 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 12 % više C skupina u odnosu na A skupinu)), 14. dana pokusa između pokusne skupine C i kontrolne skupine A (za 8 % više C skupina u odnosu na A skupinu), 21 dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 4 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 6 % više C skupina u odnosu na A skupinu) te 28. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 6 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 8 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 20).



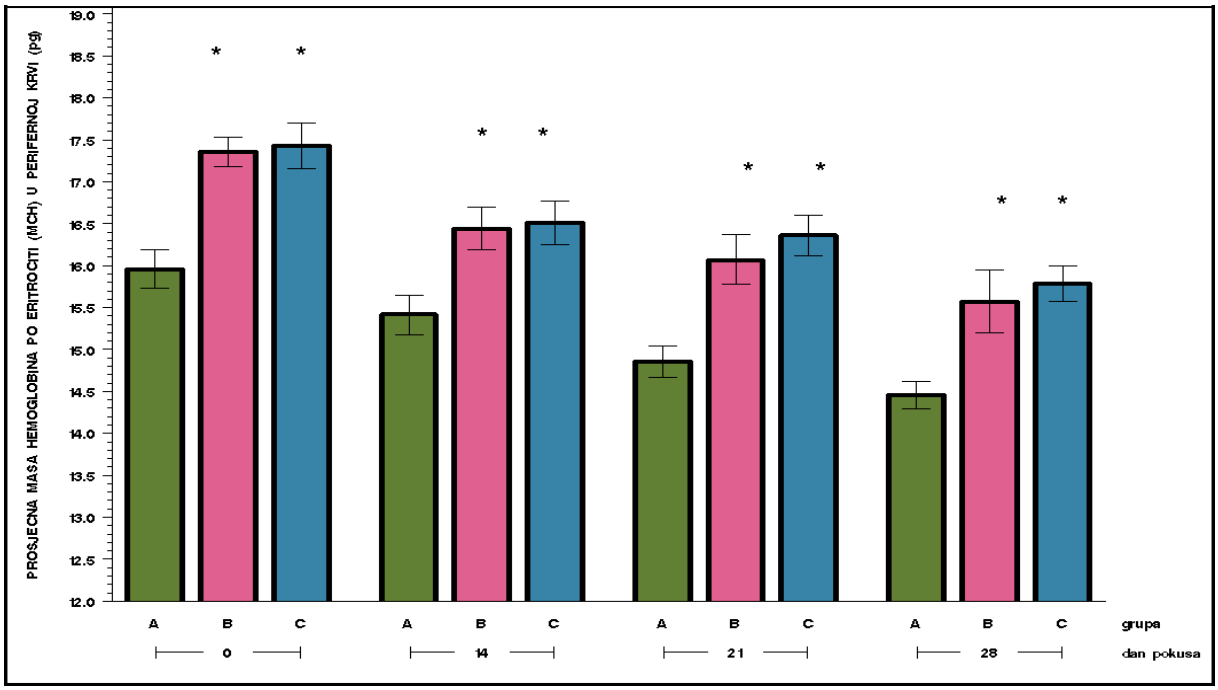
Slika 20. Volumen eritrocita (MCV) u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

U koncentraciji hemoglobina (HGB) pokusne prasadi tijekom 5 tjedana pokusa zabilježili smo statističe značajnosti 0. dana pokusa, i to među skupinama A i B (za 13 % više B skupina u odnosu na A skupinu te skupina B i C (za 13 % više B skupina u odnosu na C skupinu). 14. dana pokusa zabilježili smo statističku značajnost među skupinama A i B (za 16 % više B skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 21).



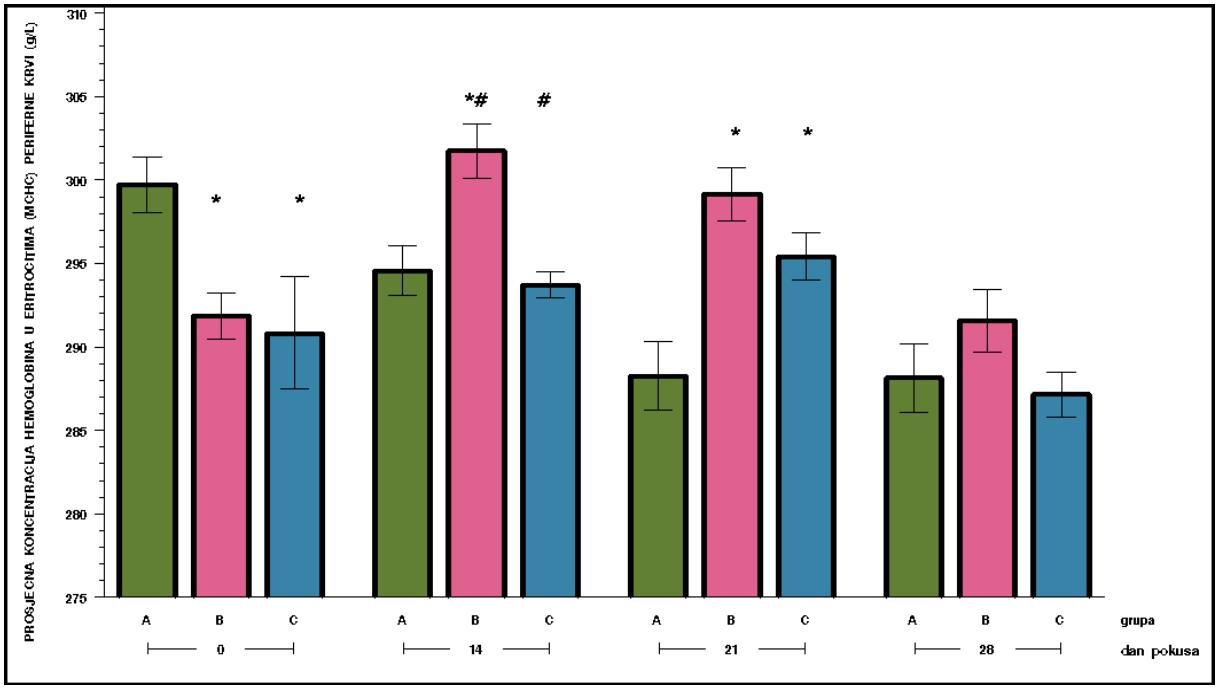
Slika 21. Koncentracija hemoglobina (HGB) u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Kod prosječne mase hemoglobina po eritrocitu (MCH) u perifernoj krvi pokusne prasadi statističke značajnosti smo zabilježili 0.dana pokusa između pokusnih grupa B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 8 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 9 % više C skupina u odnosu na A skupinu). 14. dana pokusa između pokusnih grupa B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 6 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 7 % više C skupina u odnosu na A skupinu), 21. dana pokusa između pokusnih grupa B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 8 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 9 % više C skupina u odnosu na A skupinu) i 28. dana pokusa i to između pokusnih grupa B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 7 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 8 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 21).



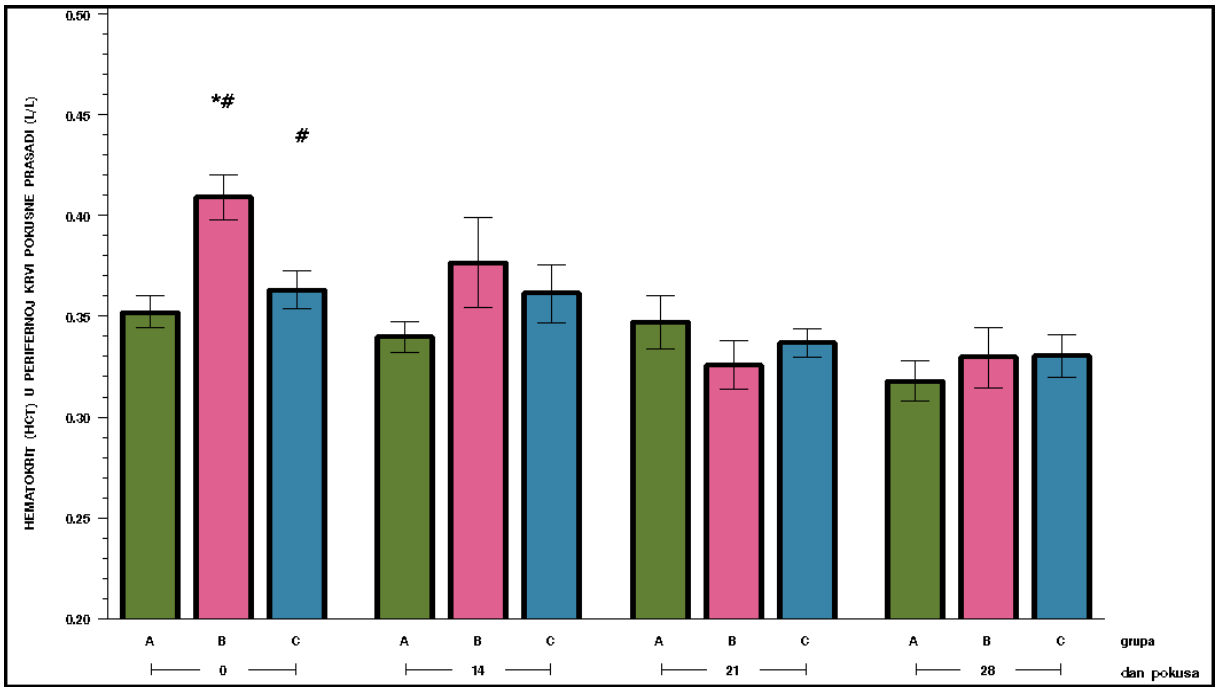
Slika 21. Prosječna masa hemoglobina po eritrocitu (MCH) u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Kod vrijednosti prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) periferne krvi statističku značajnost zabilježili smo 0. dana pokusa i to među pokusnim grupama B i C u odnosu na kontrolnu skupinu (za 3 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 1 % više C skupina u odnosu na A skupinu); 14. dana pokusa između pokusne grupe B i kontrolne grupe A (za 4 % više B skupina u odnosu na A skupinu) te međusobnu značajnost među pokusnim skupinama B i C (za 4 % više B skupina u odnosu na C skupinu); 21. dana pokusa među pokusnim skupinama B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 5 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 3 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 22).



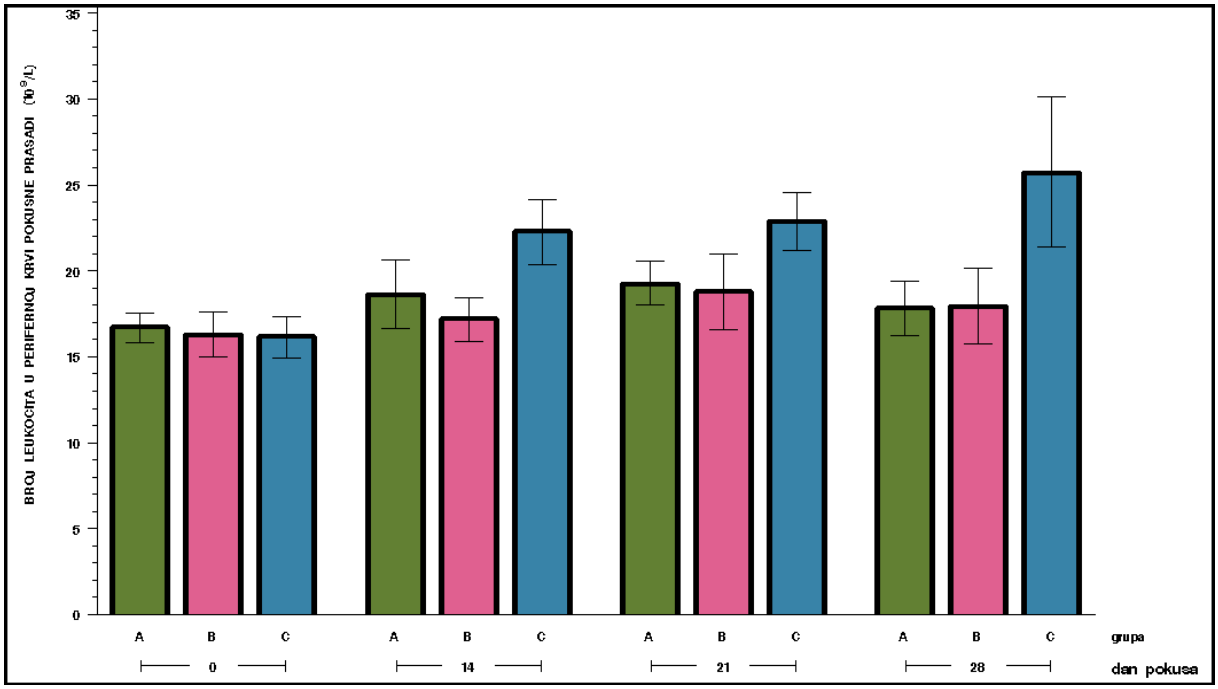
Slika 22. Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Kod vrijednosti hematokrita (HCT) tijekom pokusa sattističke značajnosti su uočene samo 0. dana pokusa i to među skupinama pokusne skupine B u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 15 % više B skupina u odnosu na A skupinu) te među pokusnim skupinama B i C (za 13 % više B skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 23).



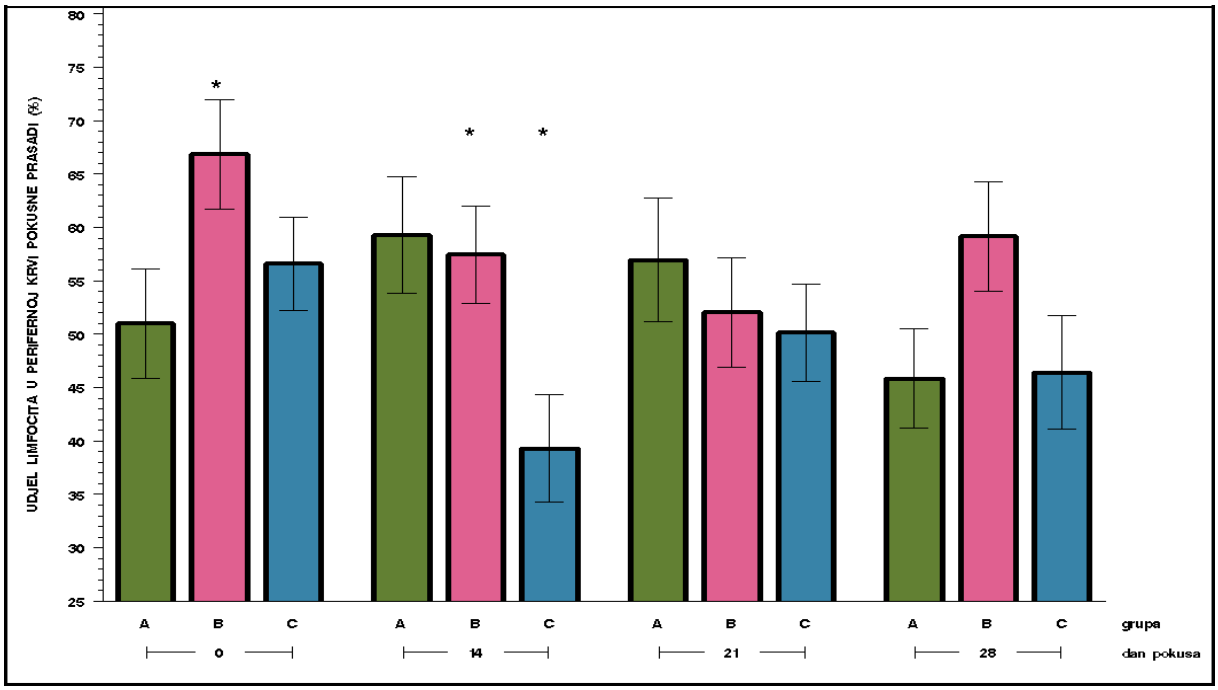
Slika 23. Hematokrit (HCT) u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Broj leukocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 5 tjedana trajanja pokusa nije se značajnije mijenjao u odnosu na 0. dan pokusa. Od 14. dana pokusa do 28. dana pokusa skupina C pokazuje povećanje broja leukocita u odnosu na skupinu A ali bez zabilježene statističke značajnosti (Slika 24). Tako na kraju pokusa leukociti skupine C za 36 % su brojniji u odnosu na skupine A i B.



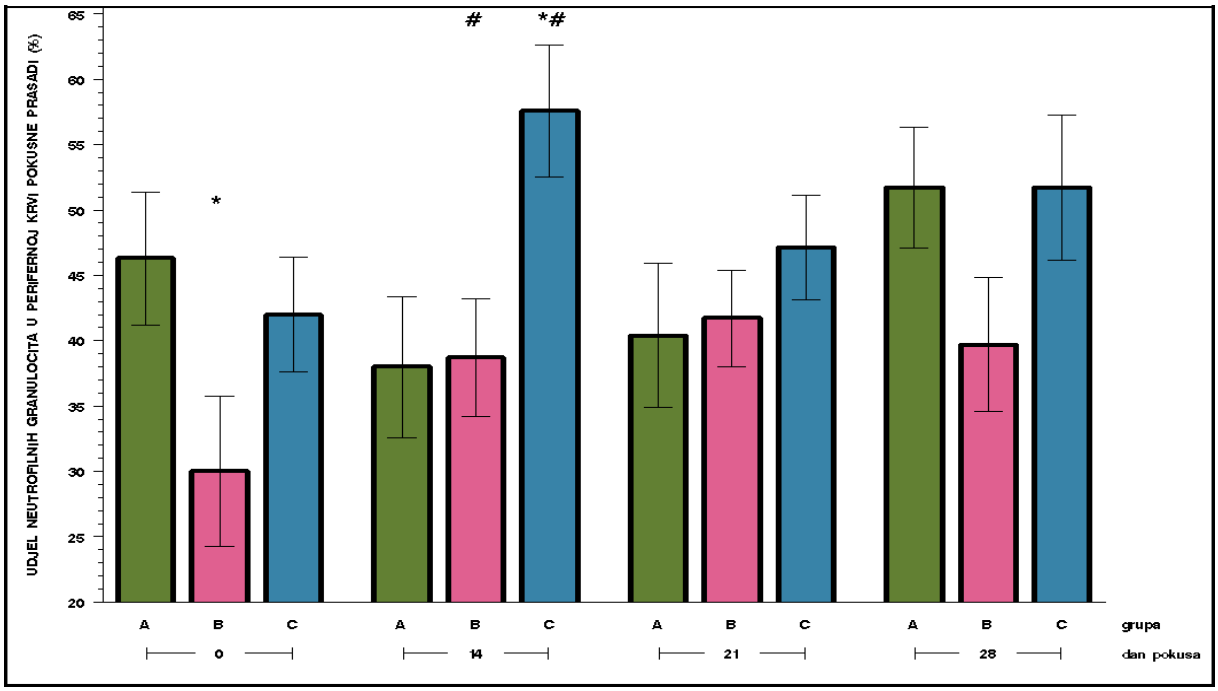
Slika 24. Broj leukocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana trajanja pokusa statističku značajnost u broju limfocita periferne krvi pokusne prasadi zabilježili smo 0. dana pokusa i to između pokusne skupine B i kontrolne skupine A (za 33 % više B skupina u odnosu na A skupinu). Nadalje 14. dana pokusa uočena je statistička značajnost u broju limfocita periferne krvi između pokusnik skupina B i C u osnosu na kontrolnu skupinu A (za 2 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 35 % više A skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 2).



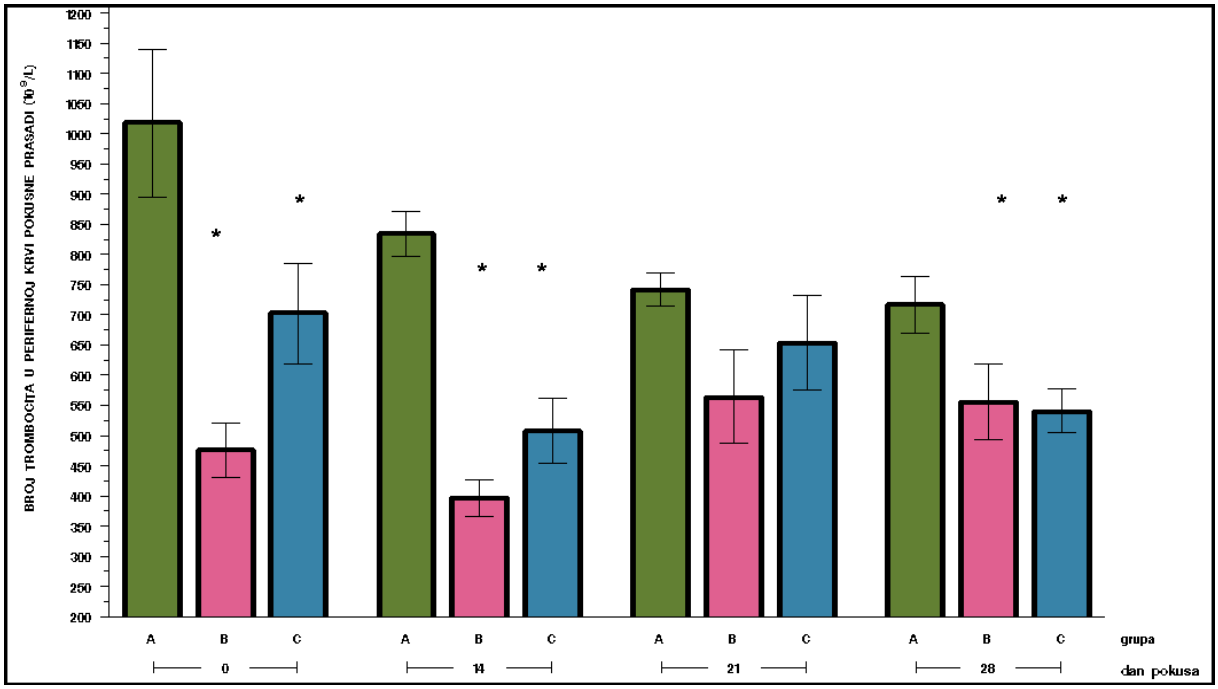
Slika 25. Udjel limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana pokusa statističku značajnost u broju neutrofilnih granulocita periferne krvi zabilježili smo 0. dana pokusa i to između pokusne skupine B i kontrolne skupine A (za 35 % više A skupina u odnosu na B skupinu), te 14. dana pokusa između pokusne skupine C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 46 % više C skupina u odnosu na A skupinu) te među pokusnim skupina B i C (za 35 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 26).



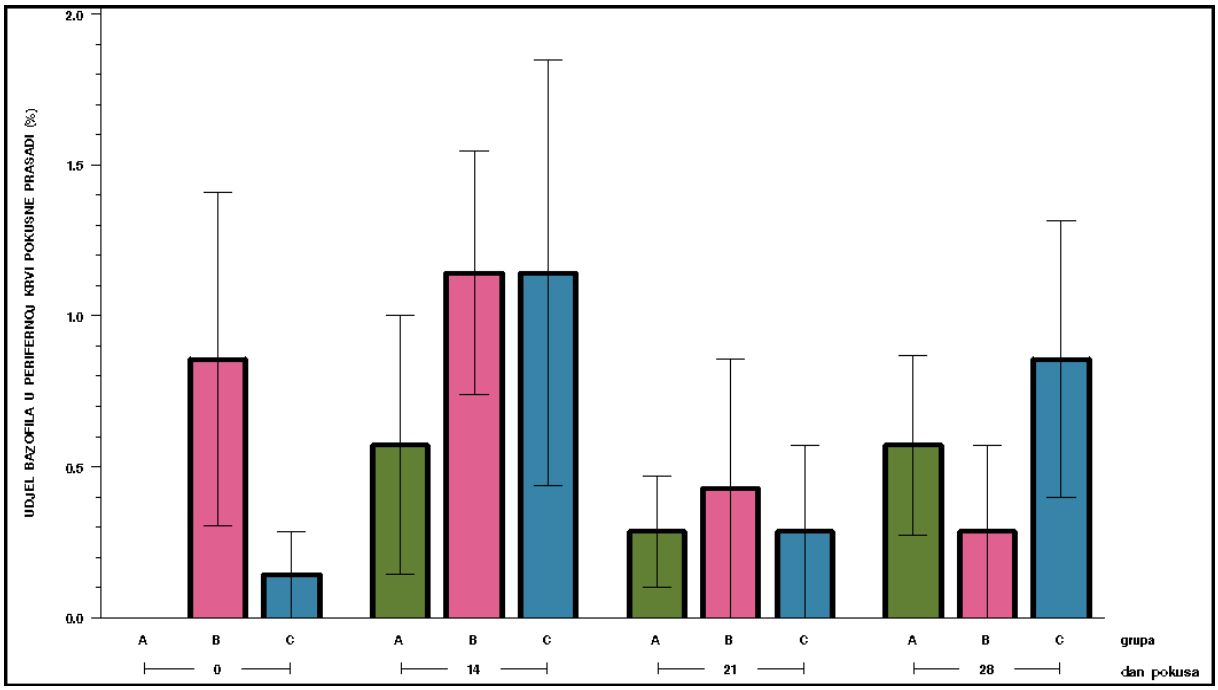
Slika 26. Udjel neutrofilnih granulocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana statističku značajnost u broju trombocita u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo 0. dana i to između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 55 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 30 % više A skupina u odnosu na C skupinu), 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 53 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 50 % više A skupina u odnosu na C skupinu) te 28. dana pokusa također između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 27 % više A skupina u odnosu na B i C skupine) (Slika 27).



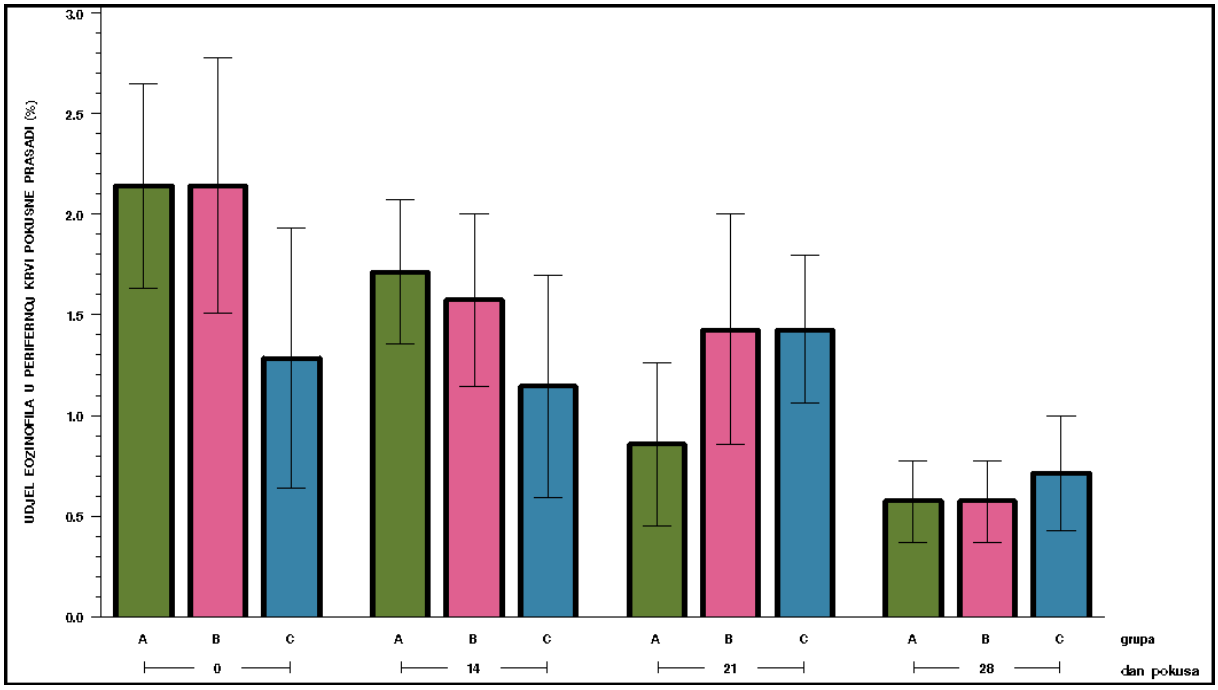
Slika 27. Udjel trombocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana pokusa udjel bazofila u perifernoj krvi pokusne prasadi nije pokazao statističku značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 28). Na kraju pokusa statistički neznačajan poras udjela bazofila za 33% više zabilježen je u skupini C u odnosu na skupinu A.



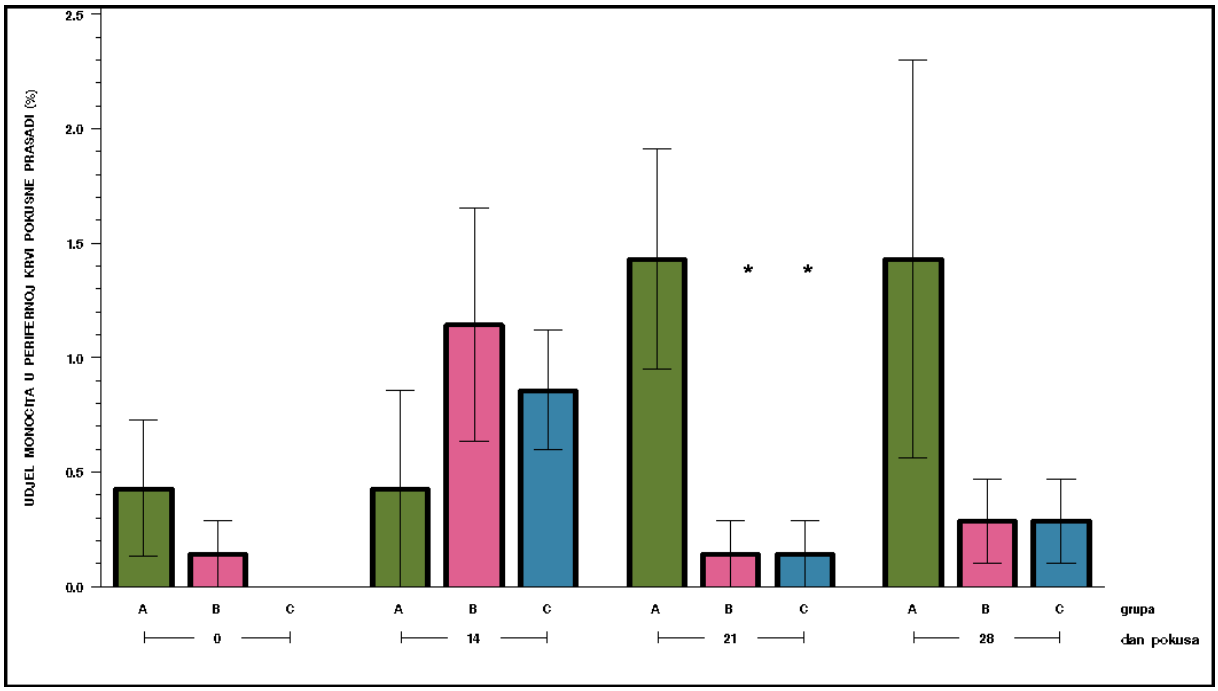
Slika 28. Udjel bazofila u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana pokusa udjel eozinofila u perifernoj krvi pokusne prasadi nije pokazao statističku značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu. U odnosu na 0. dan pokusa uočena je tendencija pada broja eozinofila u perifernoj krvi pokusne prasadi (Slika 29). Tako je na kraju pokusa u sve tri skupine za u prosjeku od 78 % zabilježen pad udjela eozina u odnosu na 0. dan pokusa.



Slika 29. Udjel eozinofila u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana pokusa udjel eozinofila u perifernoj krvi pokusne prasadi pokazao je statističku značajnost 21. dana pokusa i među pokusnim skupinama A i B u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 90 % više A skupina u odnosu na B i C skupine) (Slika 30).



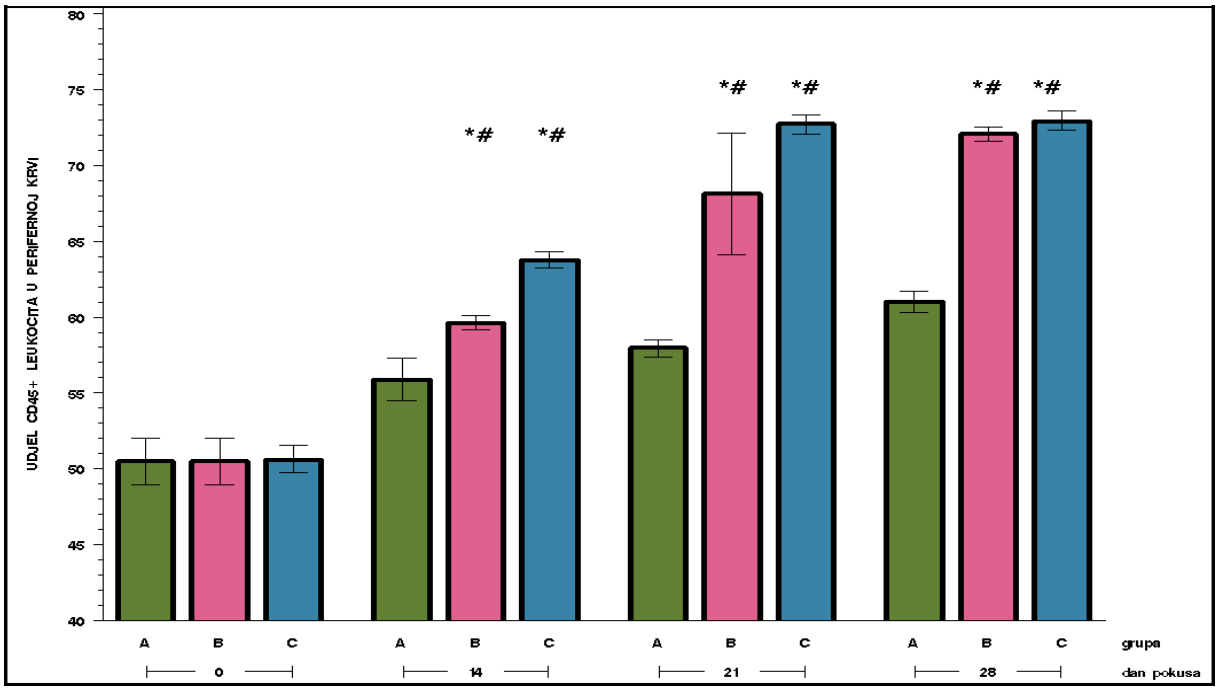
Slika 30. Udjel monocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

5.5 Imunosni pokazatelji

Utjecaj imunomodulacije pokusne prasadi testiranim pripravcima (pripravak plemenite pečurke i nativnim propolisom) utvrdili smo slijedećim pokazateljima kao što su: udjeli citolitičkih T-limfocita, B-limfocita u populaciji leukocita periferne krvi i fagocitna i mikrobicidna aktivnost granulocita i monocita periferne krvi.

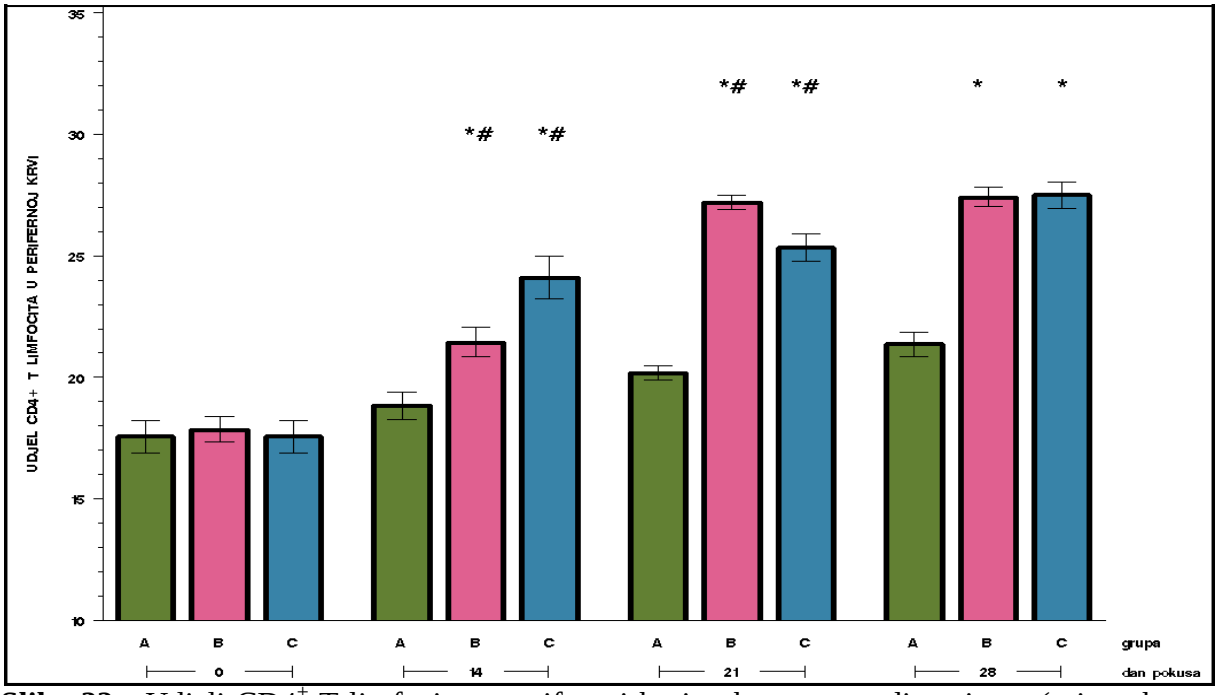
5.5.1. Udjeli leukocita, te subpopulacija T- i B-limfocita periferne krvi

Od 14. do 28. dana pokusa u pokusnim skupinama prasadi zabilježili smo porast udjela $CD45^+$ stanica u odnosu na prasad iz kontrolne skupine. Tako 14. dana pokusa uočavamo statističku značajnost između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 7 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 23 % više C skupina u odnosu na A skupinu). Također istoga dana pokusa uočavamo i statističku značajnost među pokusnim skupinama B i C (za 7 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 21. dana pokusa uočavamo statističku značajnost između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 15 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 21 % više C skupina u odnosu na A skupinu), a također i između pokusnih skupina B i C (za 7 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 28. dana pokusa statističku značajnost nalazimo između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 14 % više B i C skupine u odnosu na A skupinu), te međusobno među pokusnim skupinama B i C (za 4 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 31).



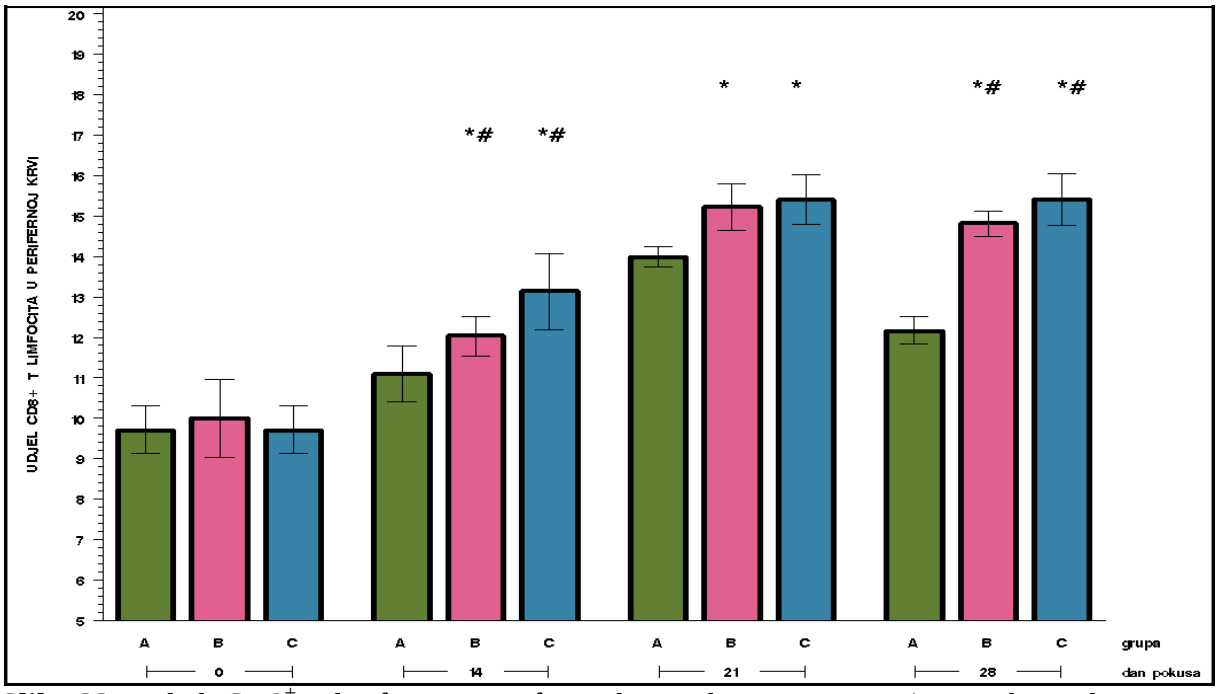
Slika 31. Udjeli $CD45^{+}$ leukocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Sličan smo nalaz tijekom pokusa zabilježili u kinetici promjena udjela $CD4^+$ pomočničkih T limfocita. Tako smo u skupinama prasadi tretiranih s pripravkom plemenite pečurke i nativnog propolisa zabilježili porast udjela $CD4^+$ stanica u odnosu na prasad kontrolne skupine od 14. do 28. dana pokusa. 14. dana pokusa statističke značajnosti smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 15 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 25 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 13 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 21. dana pokusa statističke značajnosti smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 30 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 24 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 8 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 28. dana pokusa statističku značajnost smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 33 % više B i C skupine u odnosu na A skupinu) (Slika 32).



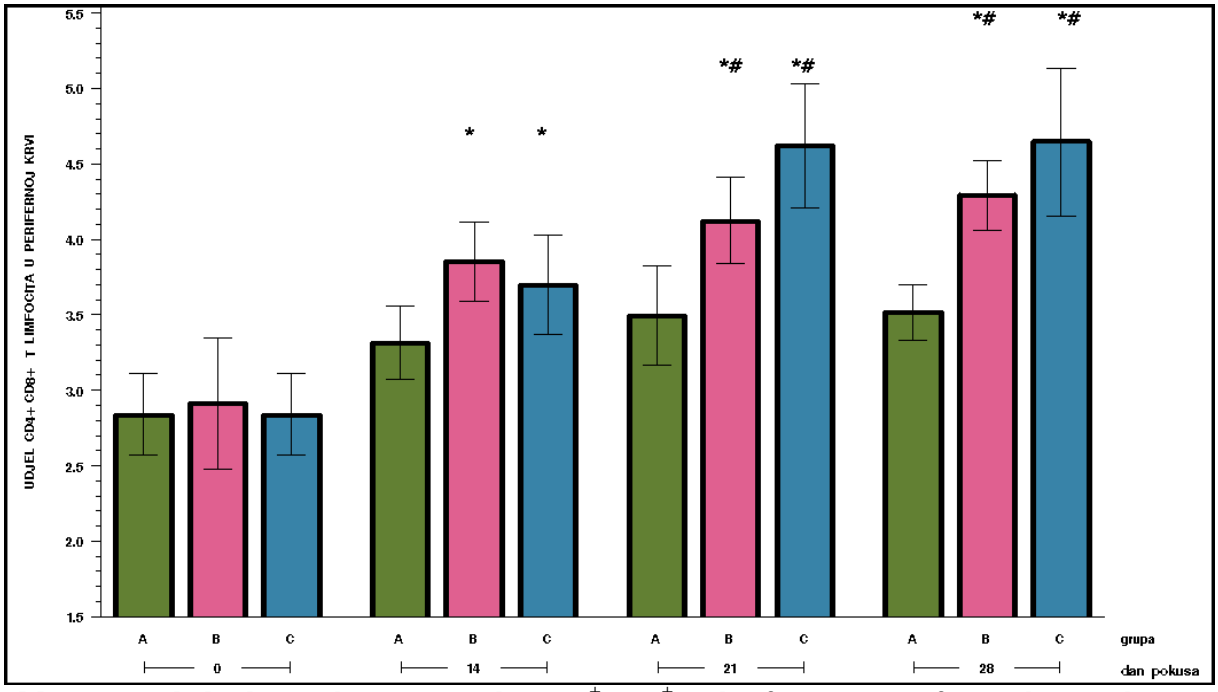
Slika 32. Udjeli $CD4^+$ T-limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Kinetika promjena udjela $CD8^+$ citolitičkih T-limfocita (T_c) slična je s onom koju smo utvrdili za T_h stanice tijekom pokusa. Na kraju pokusa, u tretirane smo prasadi zabilježili porast udjela $CD4^+$ stanica u odnosu na netretiranu prasad. Statističe značajnosti udjela $CD8^+$ citolitičkih T-limfocita smo uočili 14. dana pokusa i to između između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 8 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 16 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 8 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 21. dana pokusa statističke značajnosti su uočene između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 8 % više B i C skupine u odnosu na A skupinu). 28. dana pokusa statističke značajnosti smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 20 % više B i C skupine u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 3 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 33).



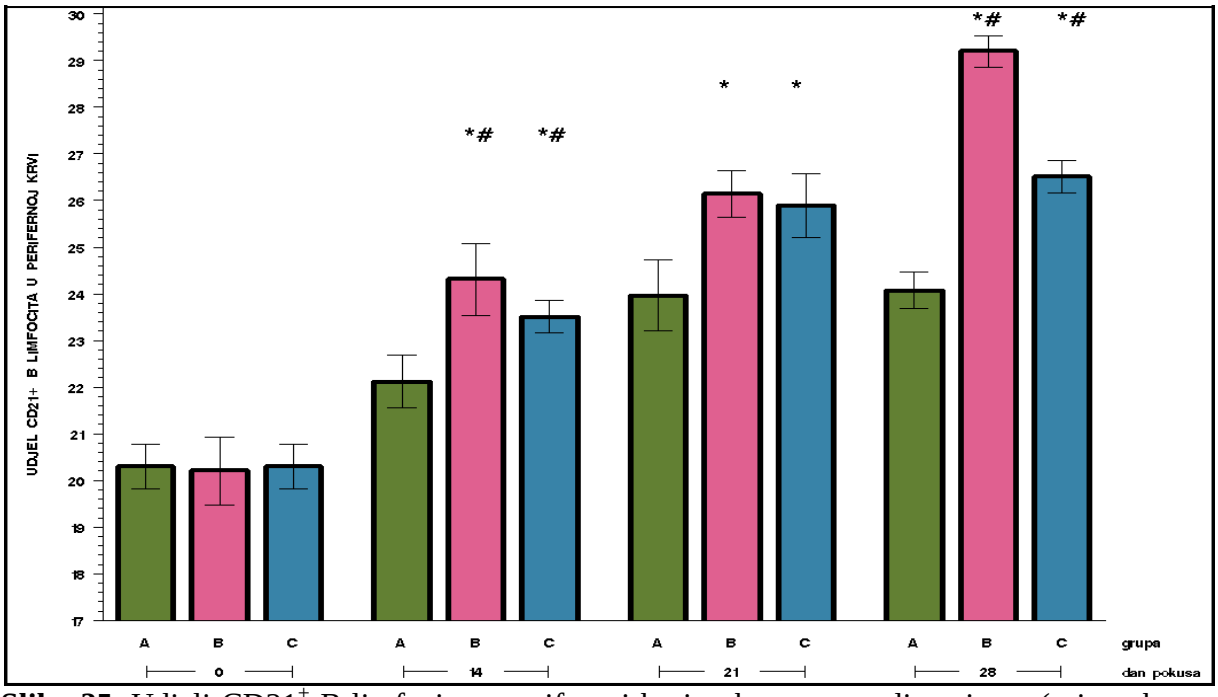
Slika 33. Udjeli $CD8^+$ T-limfocita u perifernoj krvi pokusne tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0{,}005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0{,}005$).

Dvostruko pozitivne izvantimusne $CD4^+CD8^+$ T-limfocite najbolje je stimulirao nativni propolis, počevši od 21. dana pa do kraja pokusa. 14. dana pokusa uočene su statističke značajnosti između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 14 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 12 % više C skupina u odnosu na A skupinu). 21. dana pokusa statističke značajnosti smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 15 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 21 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 10 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 28. dana pokusa statističke značajnosti smo uočili između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 17 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 26 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 11 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 34).



Slika 34. Udjeli dvostruko pozitivnih $CD4^+CD8^+$ T-limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom cijelog pokusa u skupinama tretirane prasadi zabilježili smo porast udjela CD21+ stanica u odnosu na prasad iz kontrolne skupine. Naime, već 14. dana pokusa najbolji imunostimulacijski učinak pripravak plemenite pečurke i taj je učinak zadržao do kraja pokusa. 14. dana pokusa uočene su statističke značajnosti između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 10 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 6 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 4 % više B skupina u odnosu na C skupinu). 21. dana pokusa uočene su statističke značajnosti između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 8 % više B i C skupine u odnosu na A skupinu). 28. dana pokusa uočene su statističke značajnosti između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 18 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 8 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 11 % više B skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 35).

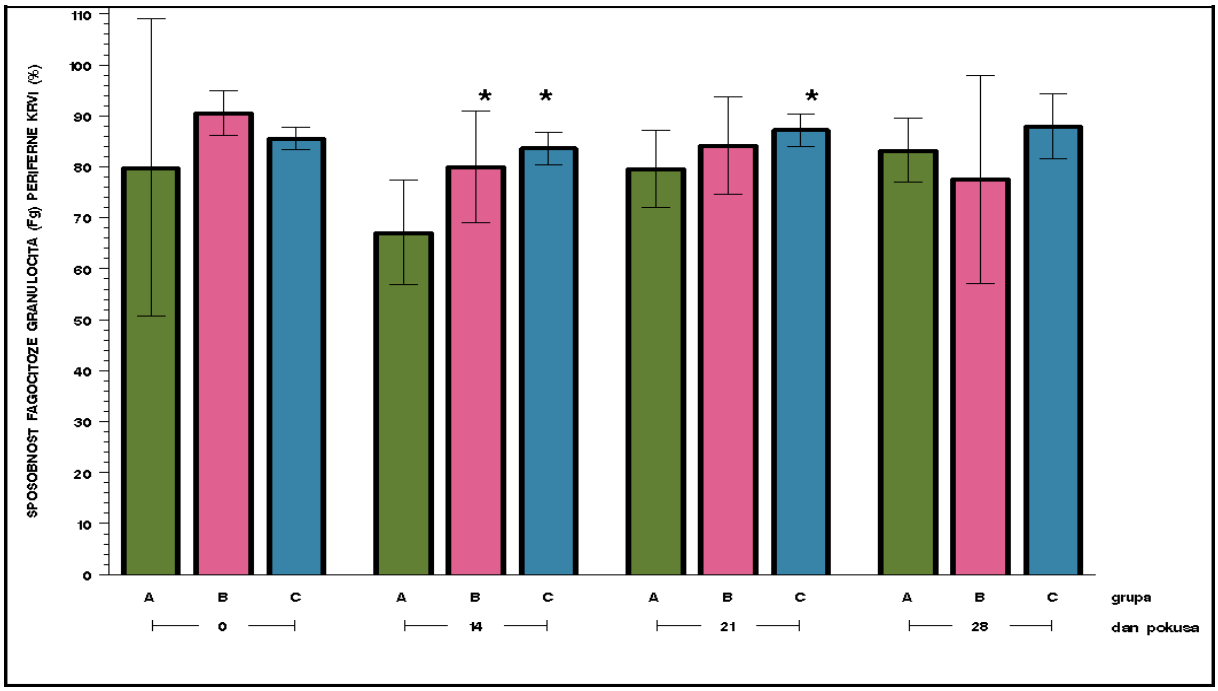


Slika 35. Udjeli $CD21^+$ B limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

5.5.2. Sposobnost fagocitoze/mikrobicidnosti granulocita i monocita

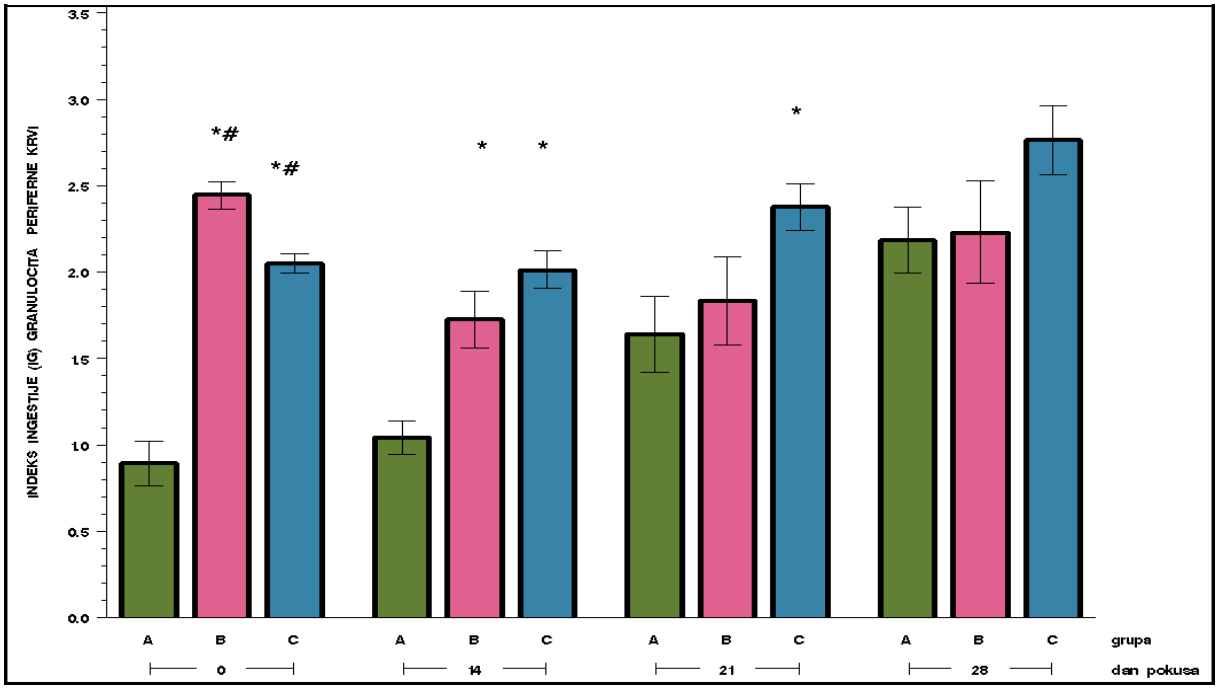
Sposobnost fagocitoze (ingestije) i unutarstaničnog ubijanja (mikrobicidnosti) granulocita i monocita pokusne prasadi prije imunizacije (0. dan) i tijekom 6 tjedana nakon tretiranja pripravkom plemenite pečurke ili nativnog propolisa prikazani su na Slikama 36-46.

Analizom kinetike promjena sposobnosti fagocitoze granulocita tijekom 5 tjedana pokusa ustanovili smo povoljne učinke istraživanih pripravaka. Nativni propolis je pokazao bolji rezulat u odnosu na kontrolu od 14. dana do kraja pokusa. Statističke značajnosti smo uočili 14. dana pokusa i to između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 17 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 24 % više C skupina u odnosu na A skupinu). 21. dana pokusa između pokusne skupine C u odnosu na kontrolu A (za 10 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 36).



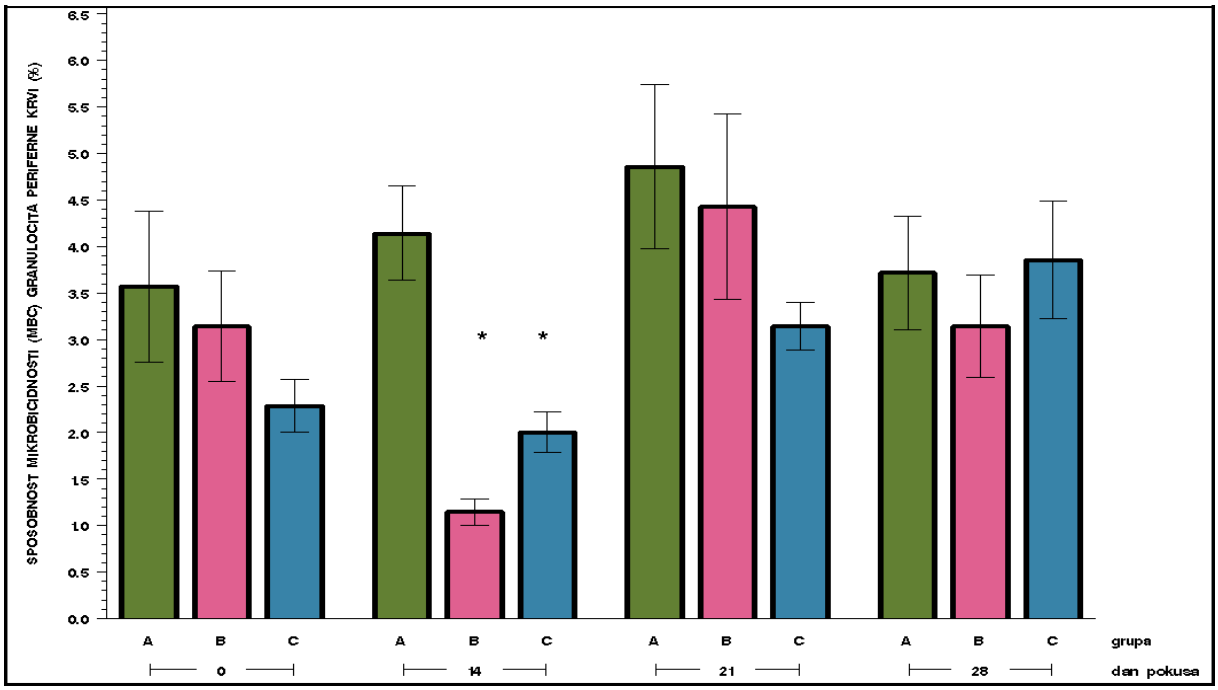
Slika 36. Sposobnost fagocitoze granulocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Analizom kinetika promjena indeksa ingestije granulocita tijekom 5 tjedana pokusa ustanovili smo povoljne učinke većine istraživanih pripravaka. Tijekom cijelog pokusa najpovoljnije na ingestijsku sposobnost granulocita periferne krvi prasadi utjecao je nativni propolis. Statističke značajnosti smo uočili 0. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 67 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 60 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 17 % više B skupina u odnosu na C skupinu). 14 dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 42 % više B skupina u odnosu na A skupinu, za 50 % više C skupina u odnosu na A skupinu) te 21. dana pokusa između pokusne skupine C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 34 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 37).



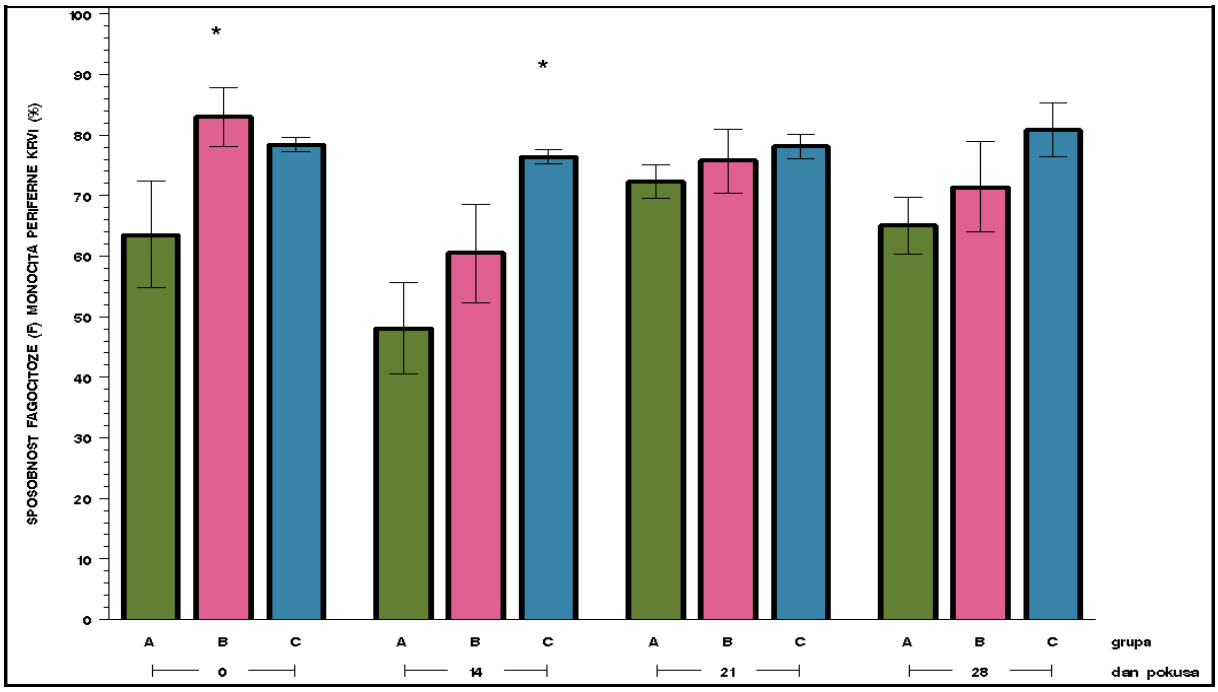
Slika 37. Indeks ingestije granulocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0{,}005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0{,}005$).

Kod oba ispitivana pripravka 14. dana pokusa došlo je do značajnog pada mikrobicidnosti granulocita periferne krvi. Daljnjim tijekom pokusa mikrobicidna sposobnost granulocita se nije značajno razlikovala između pokusnih i kontrolne skupine. Statistička značajnost je uočena 14. dana pokusa i to između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 40 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 50 % više A skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 38).



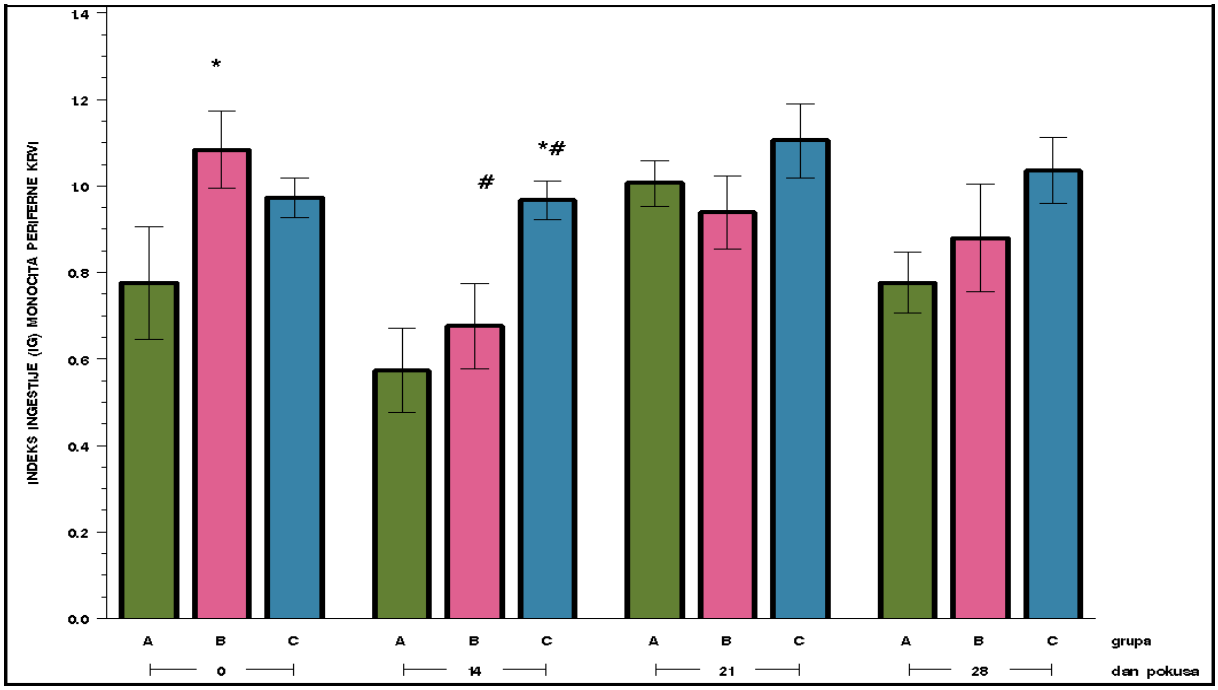
Slika 38. Sposobnost mikrobicidnosti granulocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Analiza kinetike promjene fagocitne funkcije monocita tijekom 5 tjedana pokusa u prasadi pokusnih skupina bila je kontinuirana viša, u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine. Statistička značajnost je uočena 0. dana pokusa između pokusne skupine B i kontrolne skupine A (za 27 % više B skupina u odnosu na A skupinu), te 14 dana pokusa između pokusne skupine C i kontrolne skupine A (za 36 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 39).



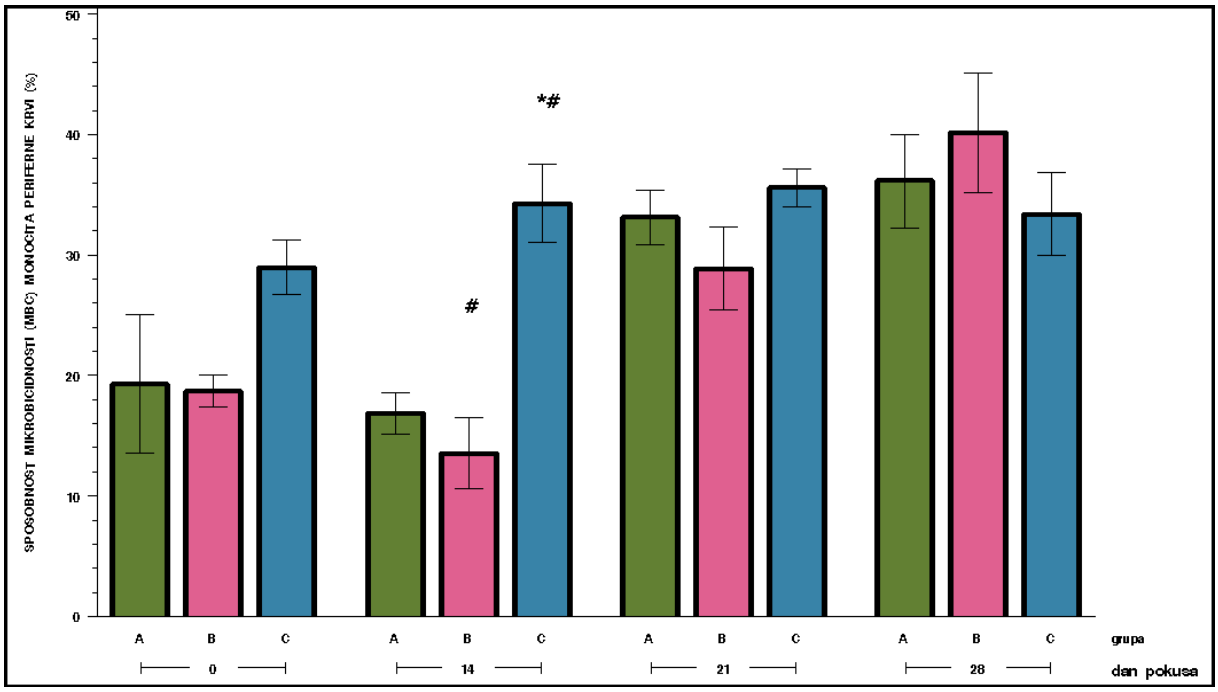
Slika 39. Sposobnost fagocitoze monocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Analiza kinetike promjena indeksa monocita tijekom 5 tjedana pokusa, pokazala je povoljne učinke istraživanih pripravaka na ingestiju mikroba. 0. dana pokusa uočena je statistička značajnost između pokusne skupine B i kontrolne skupine A (za 24 % više B skupina u odnosu na A skupinu). 14. dana pokusa uočena je statistička značajnost između pokusne skupine C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 40 % više C skupina u odnosu na A skupinu) te između pokusnih skupina B i C (za 22 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 40).



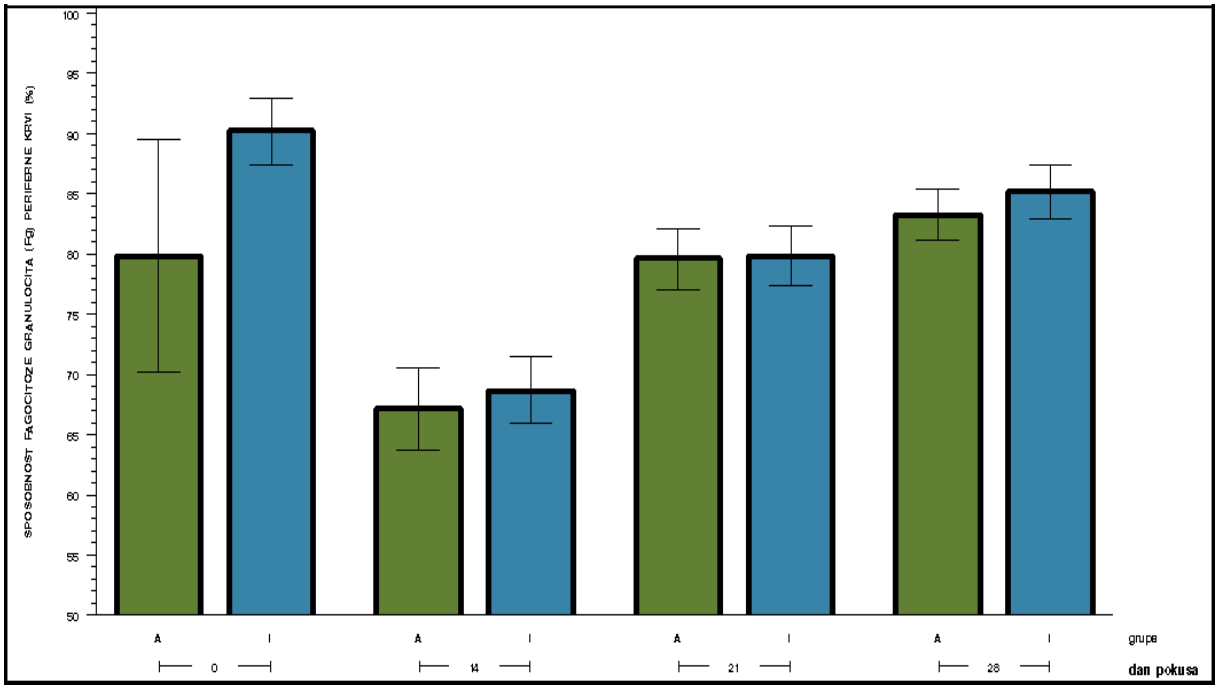
Slika 40. Indeks ingestije monocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Analiza kinetike promjena intenziteta unutarstaničnog ubijanja mikroba tijekom 5 tjedana pokusa, pokazala je povoljne učinke većine istraživanih pripravaka na tu funkciju monocita. Statistički značajna razlika je uočena 14. dana pokusa i to između pokusne skupine C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 60 % više C skupina u odnosu na A skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 65 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 41).



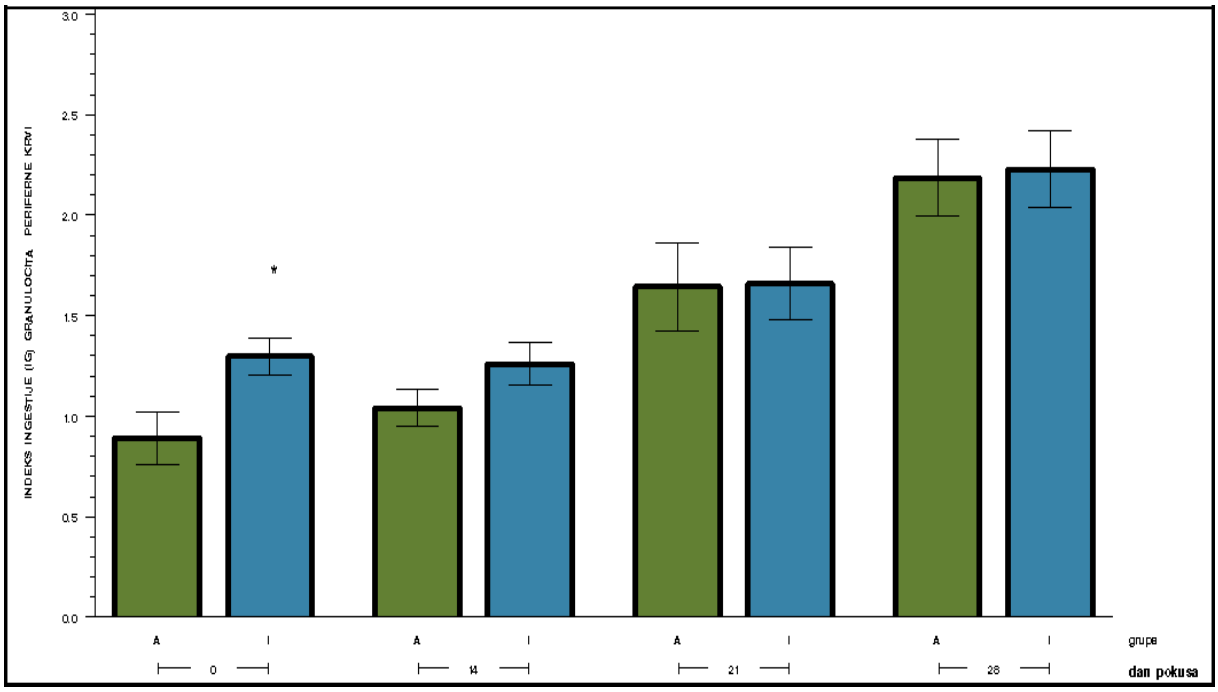
Slika 41. Sposobnost mikrobicidnosti (MBC) monocita periferne krvi pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Sposobnost fagocitoze granulocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa nije pokazala statističke značajnosti (Slika 41).



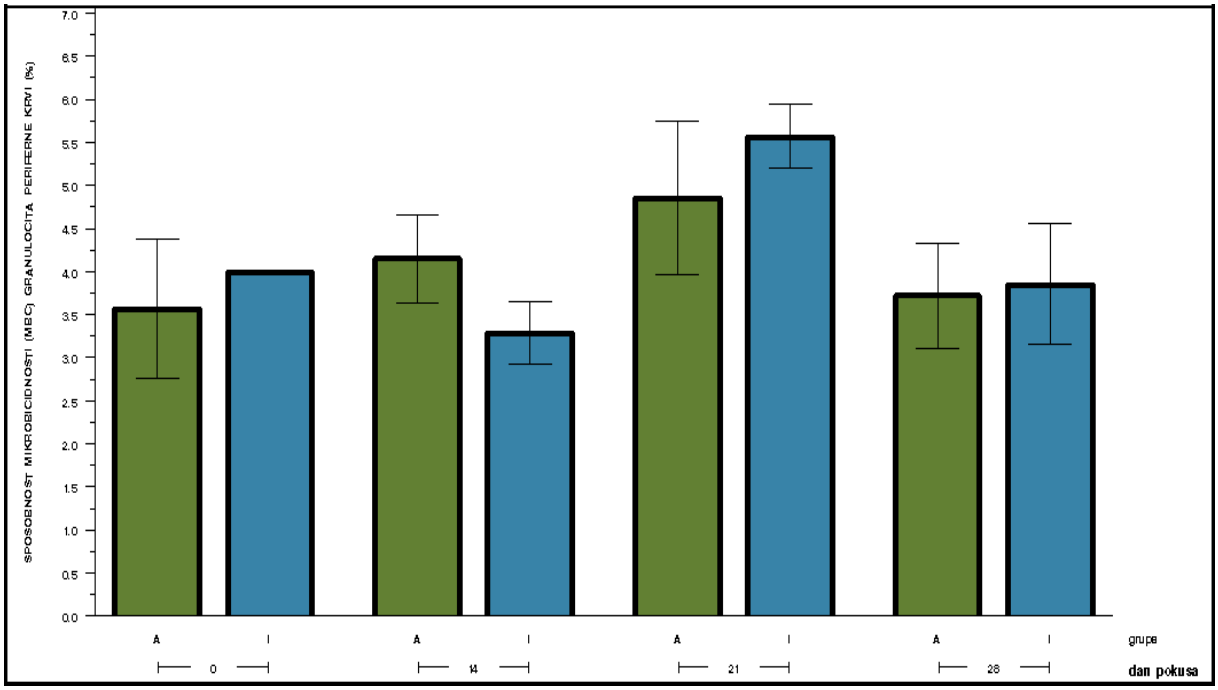
Slika 41.Sposobnost fagocitoze granulocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Analizom kinetika promjena indeksa ingestije granulocita tijekom 5 tjedana pokusa nismo ustanovili statistički značajne razliku među skupinama. Sposobnost ingestije granulocita kontinuirano je rasla u kontrolnoj i pokusnoj skupini tokom trajanja pokusa (Slika 42).



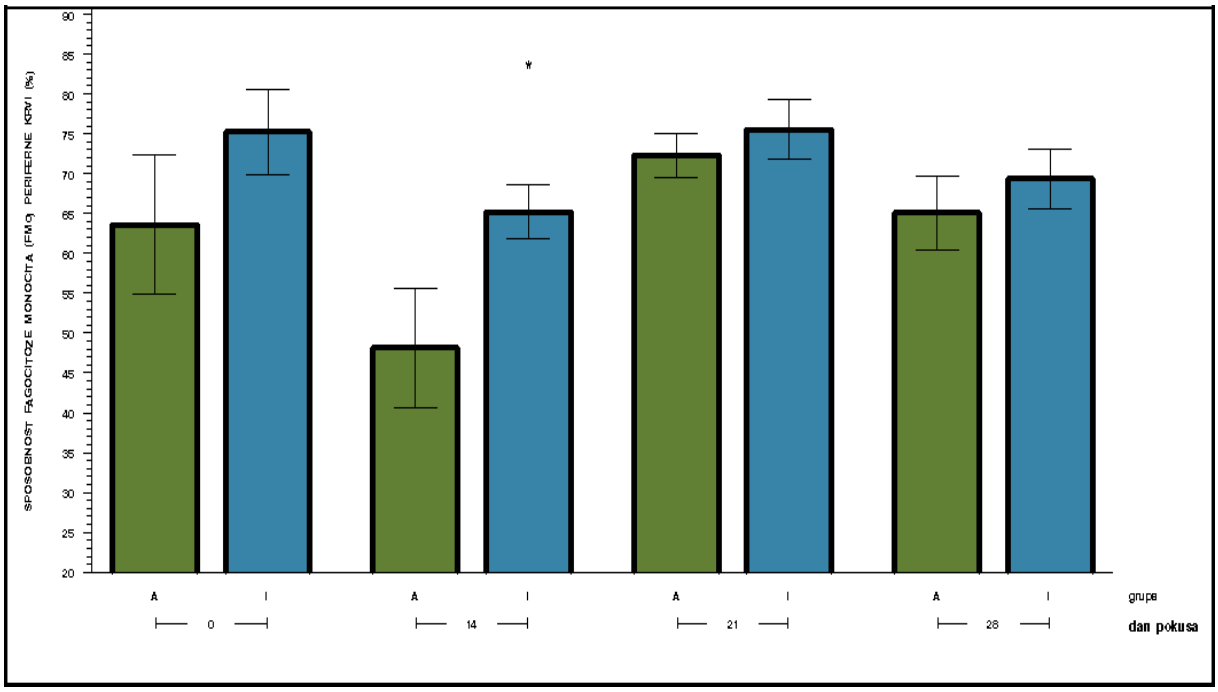
Slika 42. Indeks ingestije granulocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Sposobnost mikrobicidnosti granulocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa također nije pokazala statističke značajnosti među grupama (Slika 43).



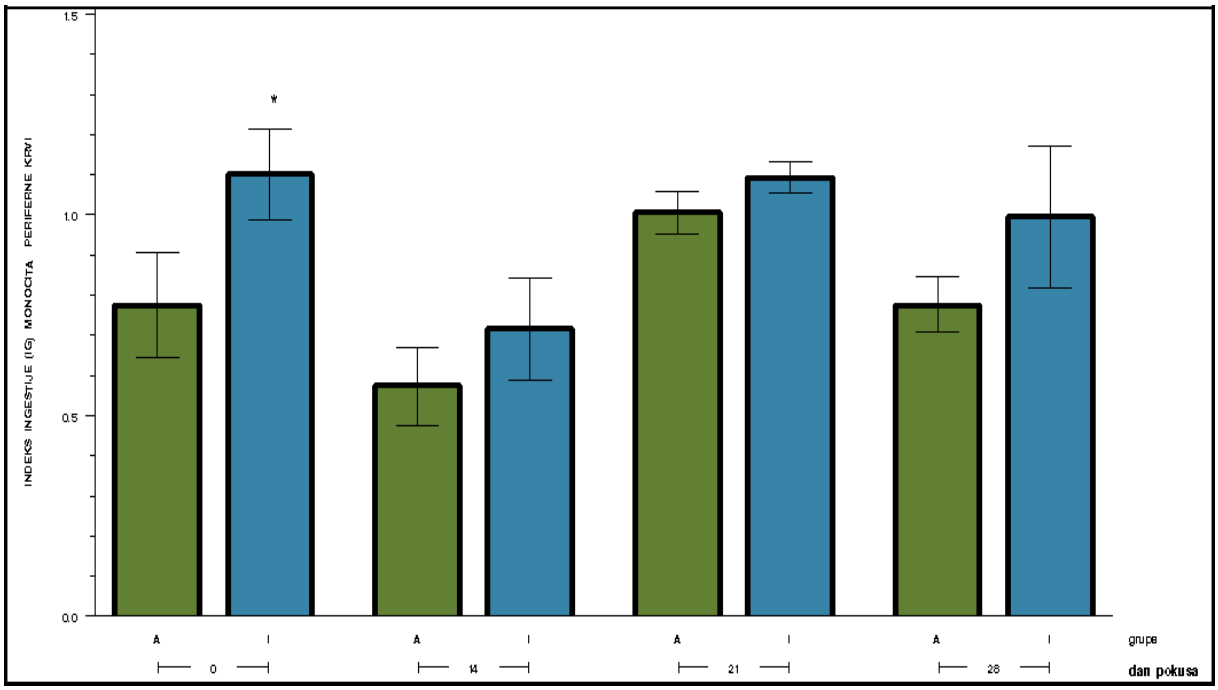
Slika 43. Sposobnost mikrobicidnosti granulocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Sposobnost fagocitoze monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa pokazala je statističku značajnost i to 14. dana pokusa između pokusne skupine I i kontrolne skupine A (za 25 % više I skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 44).



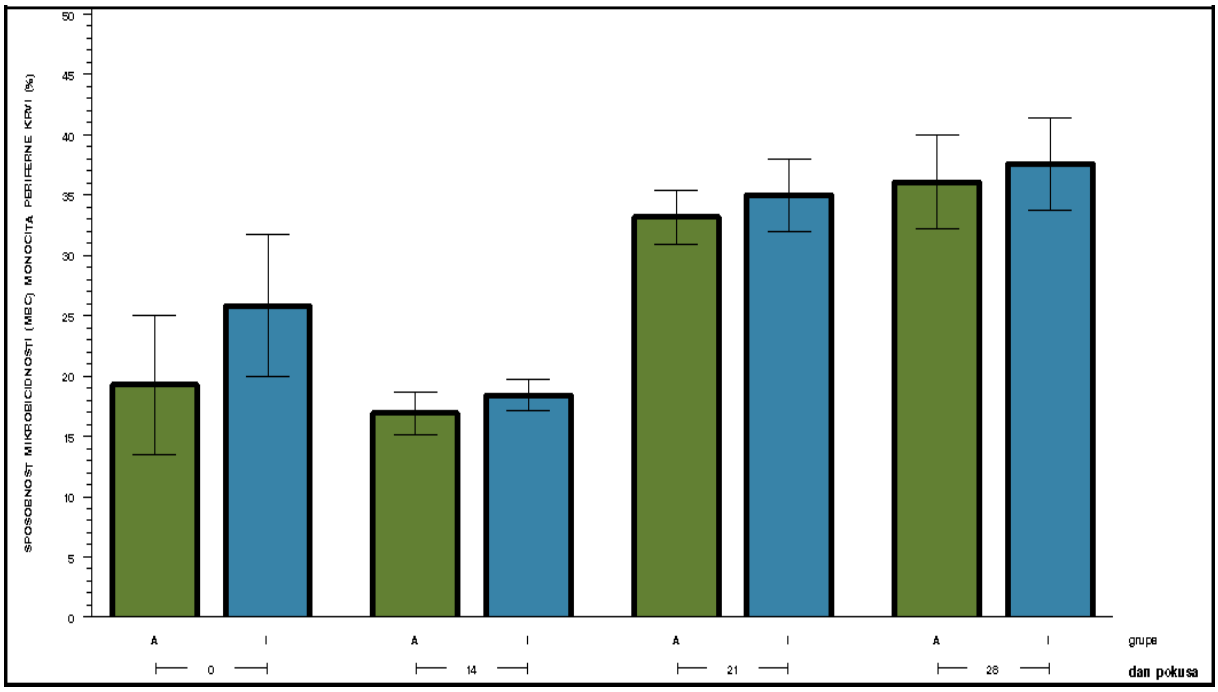
Slika 44. Sposobnost fagocitoze monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Indeks ingestije monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa pokazao je statističku značajnost 0. dana pokusa i to između pokusne skupine I i kontrolne skupine A (za 27 % više I skupina u odnosu na A skupinu). od 14. do 28 dana pokusa grupa I s dodatkom β-glukana u *in vitro* pokazala je više vrijednosti indeksa ingestije monocita ali bez zabilježenih statističkih značajnosti među skupinama (Slika 45.).



Slika 45. Indeks ingestije monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

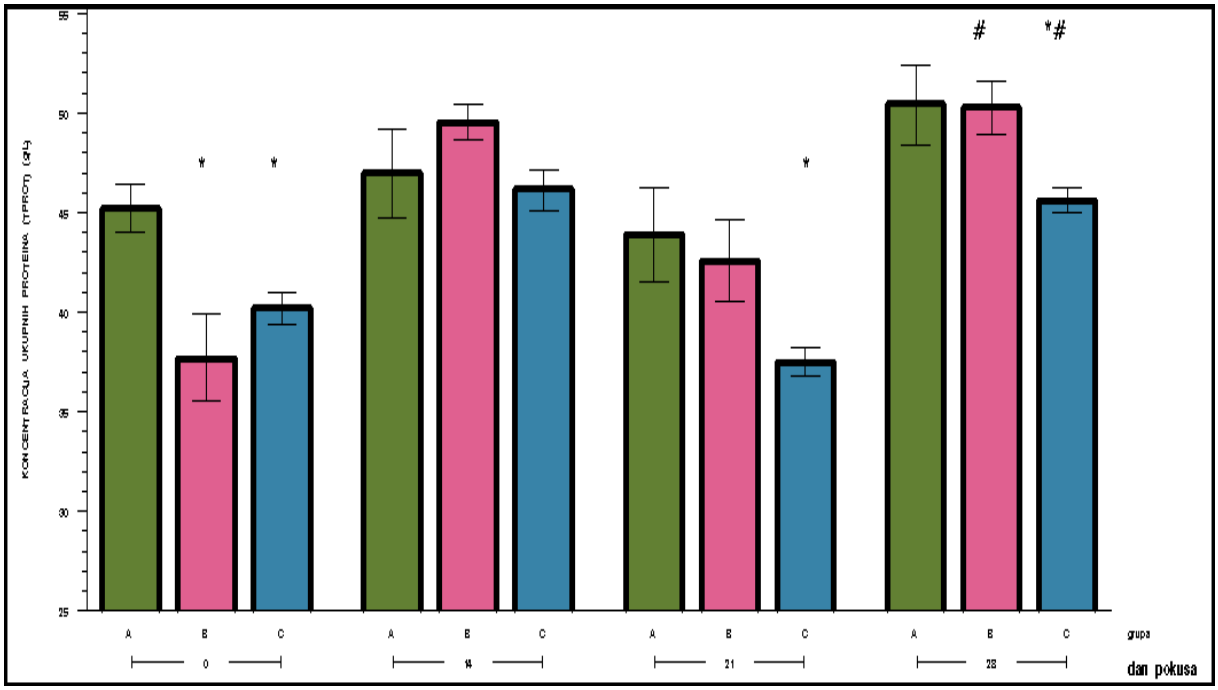
Sposobnost mikrobicidnosti monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa nije pokazao statističku značajnost među skupinama. Mikrobocodnost monocita je zadržala trend rasta do kraja pokusa s blagim većim vrijednostima pokusne skupine I (Slika 46.).



Slika 46. Sposobnost mikrobicidnosti monocita uz dodatak β-glukana u *in vitro* tijekom 5 tjedana trajanja pokusa (A skupina=kontrola; I skupina=dodatak β-glukana *in vitro*)) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

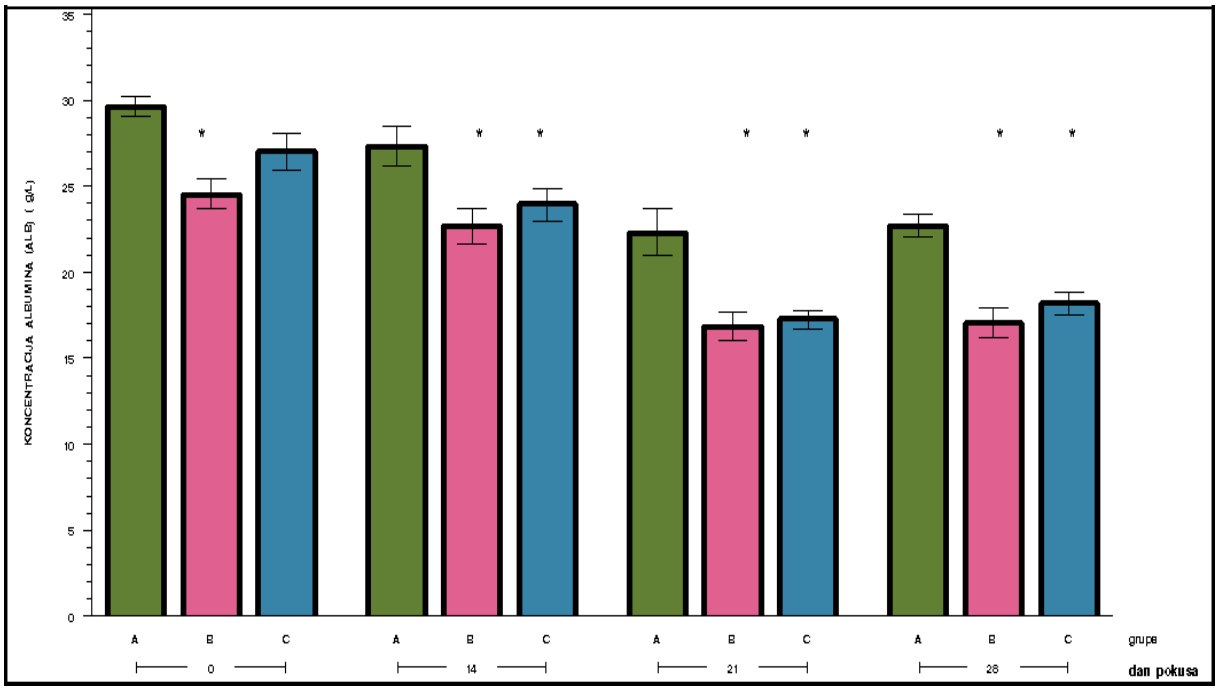
5.6. Biokemijski pokazatelji

Kod koncentracije ukupnih proteina u serume pokusne prasadi zabilježili smo statističke značajnosti 0. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 20 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 11 % više A skupina u odnosu na C skupinu). 21. dana pokusa između pokusne skupine C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 18 % više A skupina u odnosu na C skupinu). 28 dana pokusa između pokusne skupine C i kontrolne skupine A (za 18 % više A skupina u odnosu na C skupinu) te između pokusnih skupina B i C (za 14 % više B skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 47).



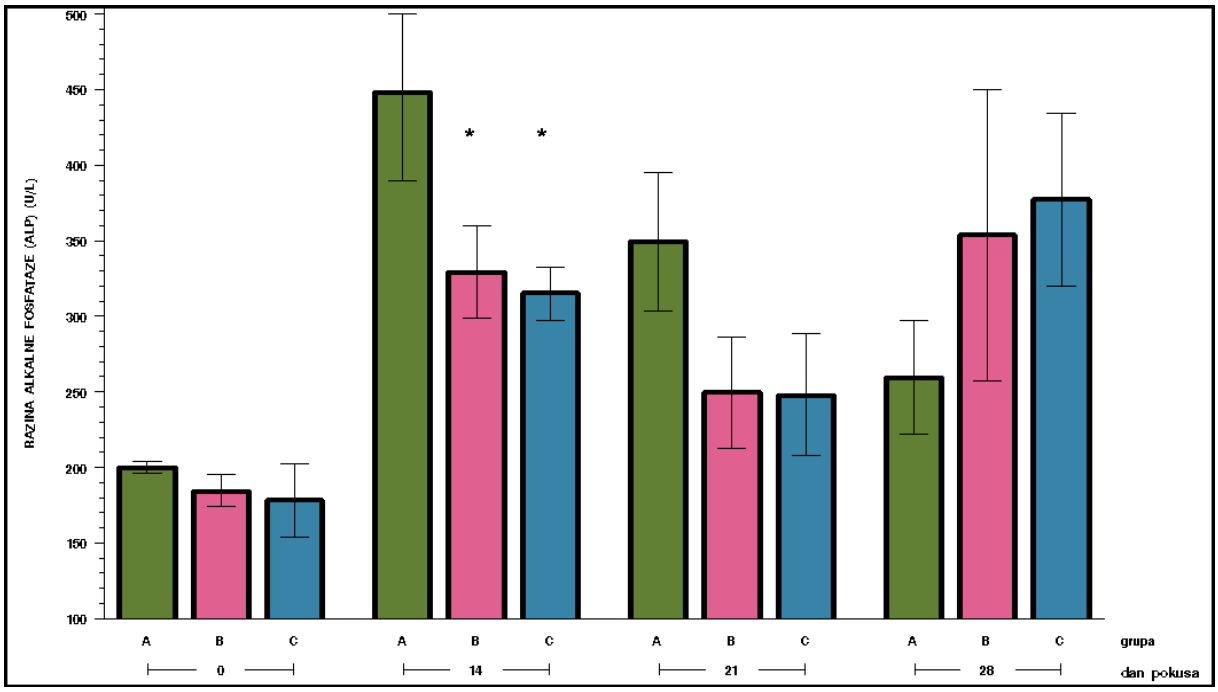
Slika 47. Koncentracija ukupnih proteina u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Koncentracija albumina u serumu pokusne prasadi pokazala je statističku značajnost 0.dana pokusa i to između pokusne skupine B u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 17 % više A skupina u odnosu na B skupinu). 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 25 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 13,8 % više A skupina u odnosu na C skupinu). 21. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 32 % više A skupina u odnosu na B i C skupinu). 28. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 28 % više A skupina u odnosu na B i C skupinu (Slika 48).



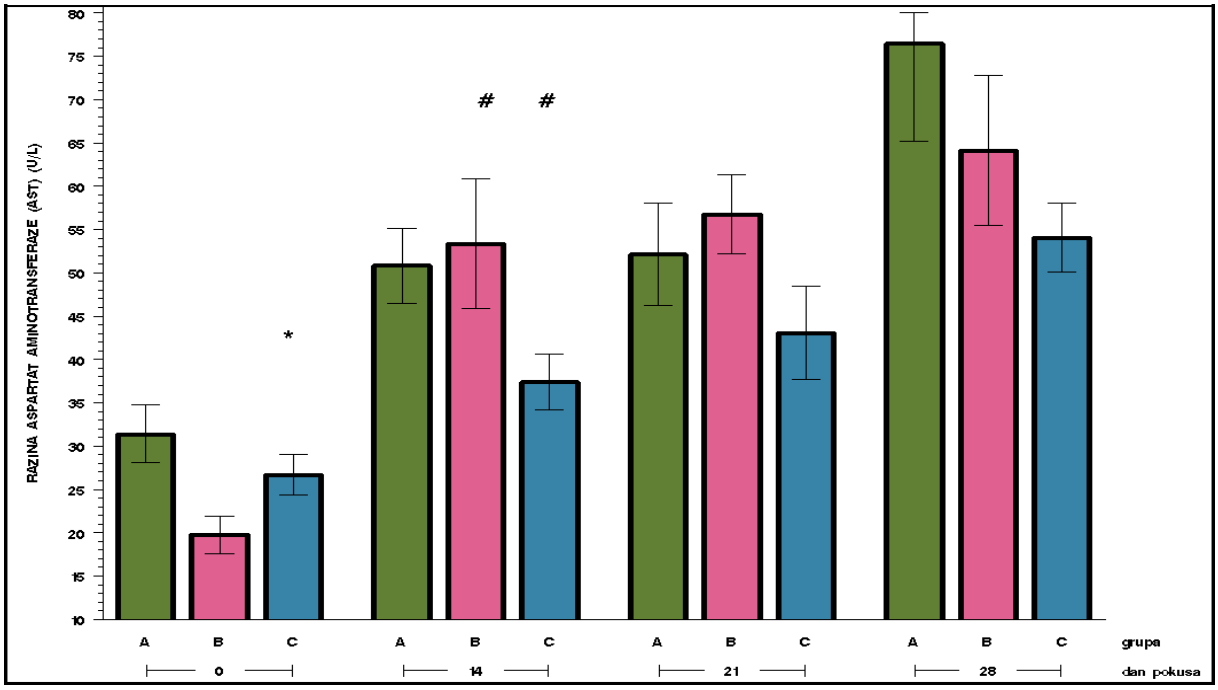
Slika 48. Koncentracija albumina u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana uočili statistički značajne razlike razine alkalne fosfataze u pokusne prasadi 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 30 % više A skupina u odnosu na B i C skupinu) (Slika 49).



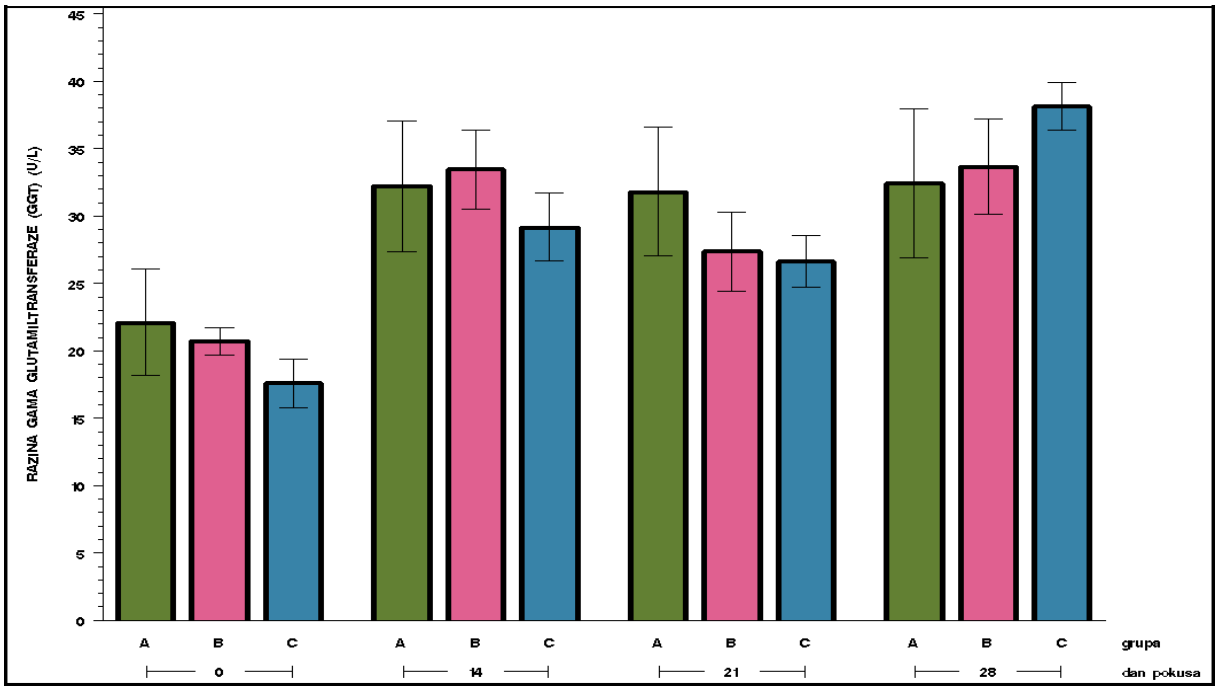
Slika 49. Razina alkalne fosfataze (ALP) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana razina aspartat aminotransferaze u serumu pokusne prasadi pokazala je statističke značajnosti 0. dana pokusa i to između pokusne skupine C i kontrolne skupine A (za 16 % više A skupina u odnosu na C skupinu). 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C (za 32 % više B skupina u odnosu na C skupinu) (Slika 50).



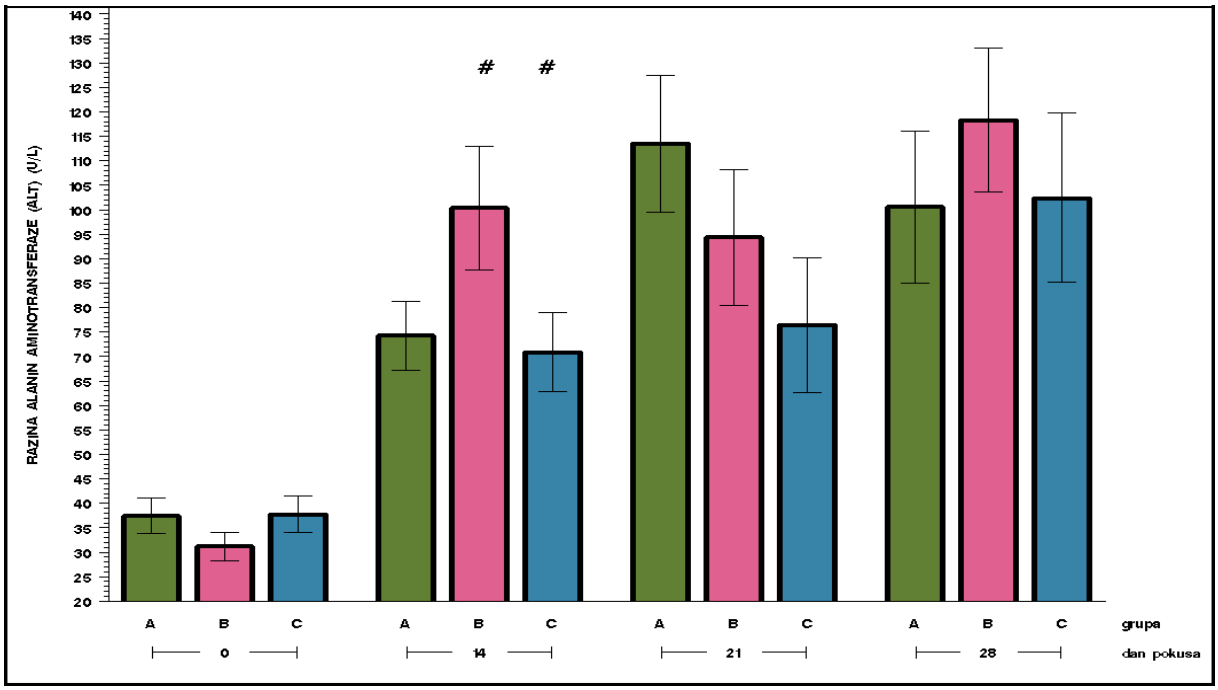
Slika 50. Razina aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom 5 tjedana pokusa razina gama glutamiltransferaze nije pokazala statističku značajnost među skupinama (Slika 51).



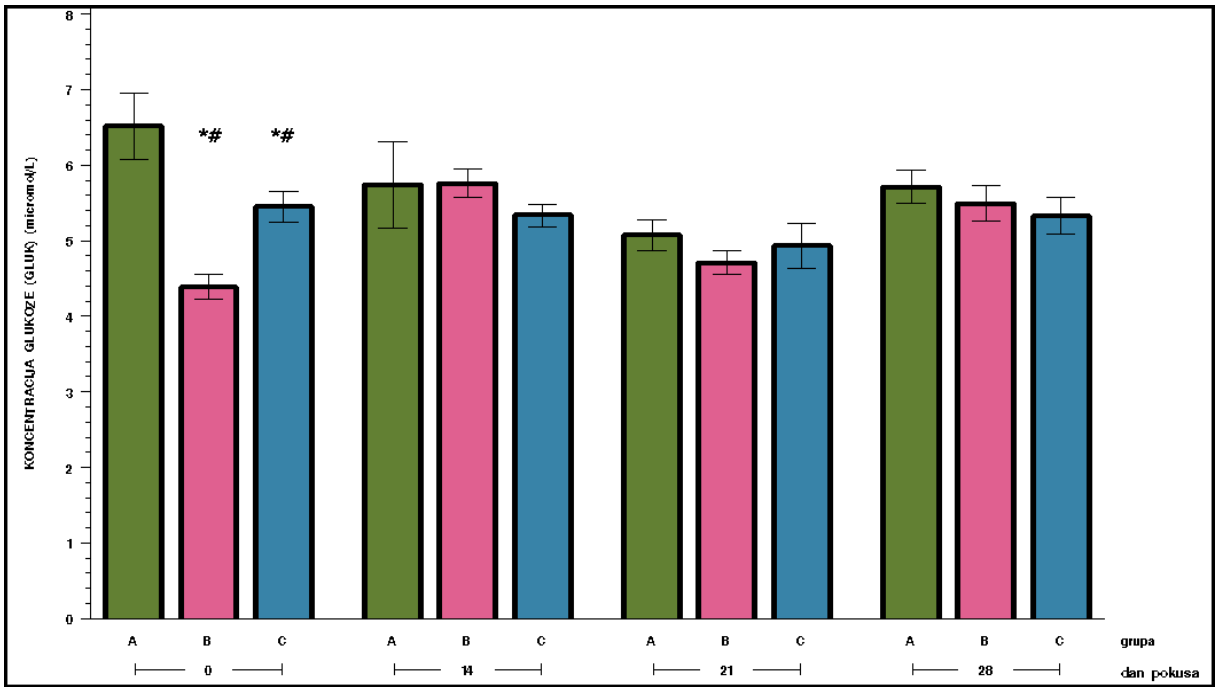
Slika 51. Razina gama glutamiltransferaze (GGT) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana zabilježili smo dobno ovisni porast razine alanin aminotransferaze pokusne prasadi. Statističku značajnost smo zabilježili 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C (za 30 % više B skupina u odnosu na C skupinu (Slika 52).



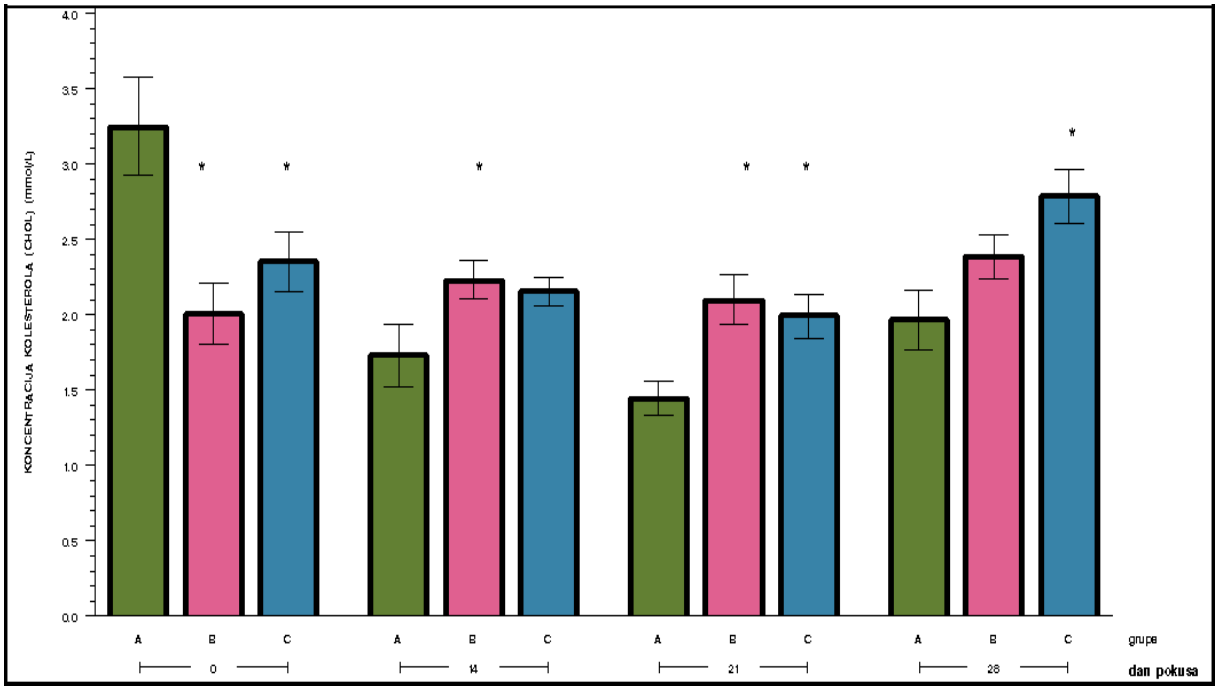
Slika 52. Razina alanin aminotransferaze (ALT) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana zabilježili smo statističku značajnost koncentracije glukoze u serumu pokusne prasadi 0. dana pokusa i to između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 34 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 15 % više A skupina u odnosu na C skupinu), te između pokusnih skupina B i C (za 12 % više C skupina u odnosu na B skupinu) (Slika 53).



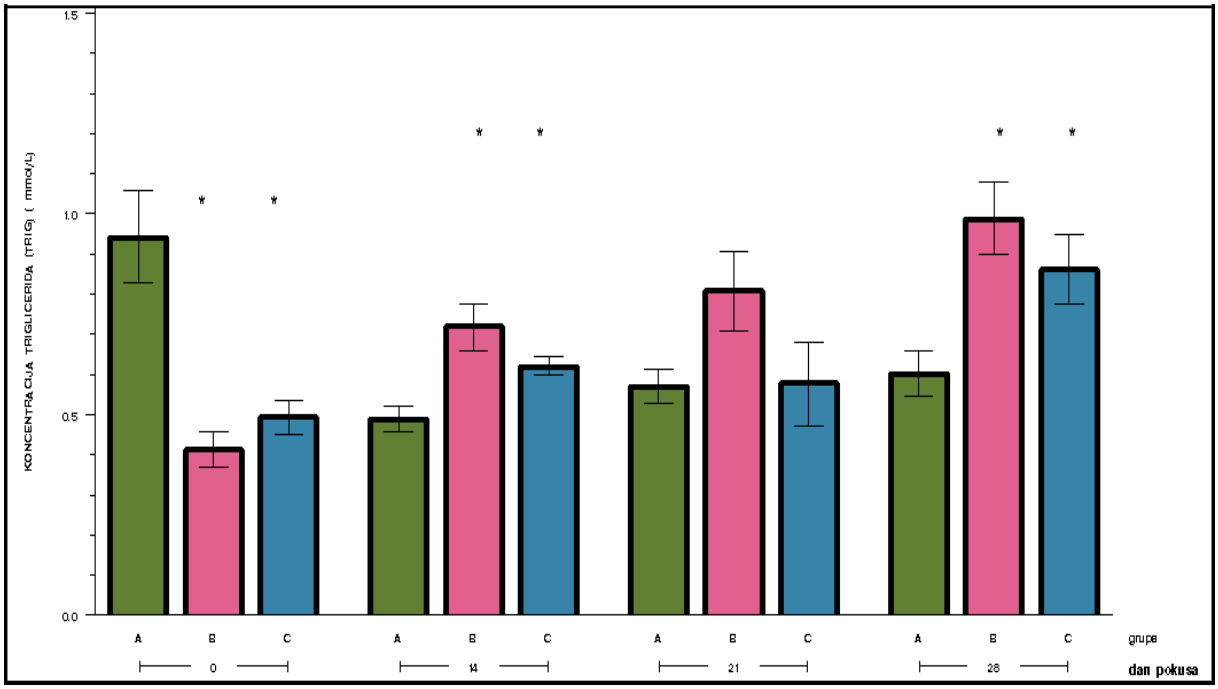
Slika 53. Koncentracija glukoze (GLUK) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana ustanovili smo statističku značajnost u razini kolesterola u serumu pokusne prasadi 0. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 37 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 25 % više A skupina u odnosu na C skupinu). 14. dana pokusa između pokusne skupine B i kontrolne skupinu A (za 30 % više B skupina u odnosu na C skupinu). 21. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 25 % više B i C skupina u odnosu na A skupinu). 28. dana pokusa između pokusne skupine C i kontrolne skupine A (za 26 % više C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 54).



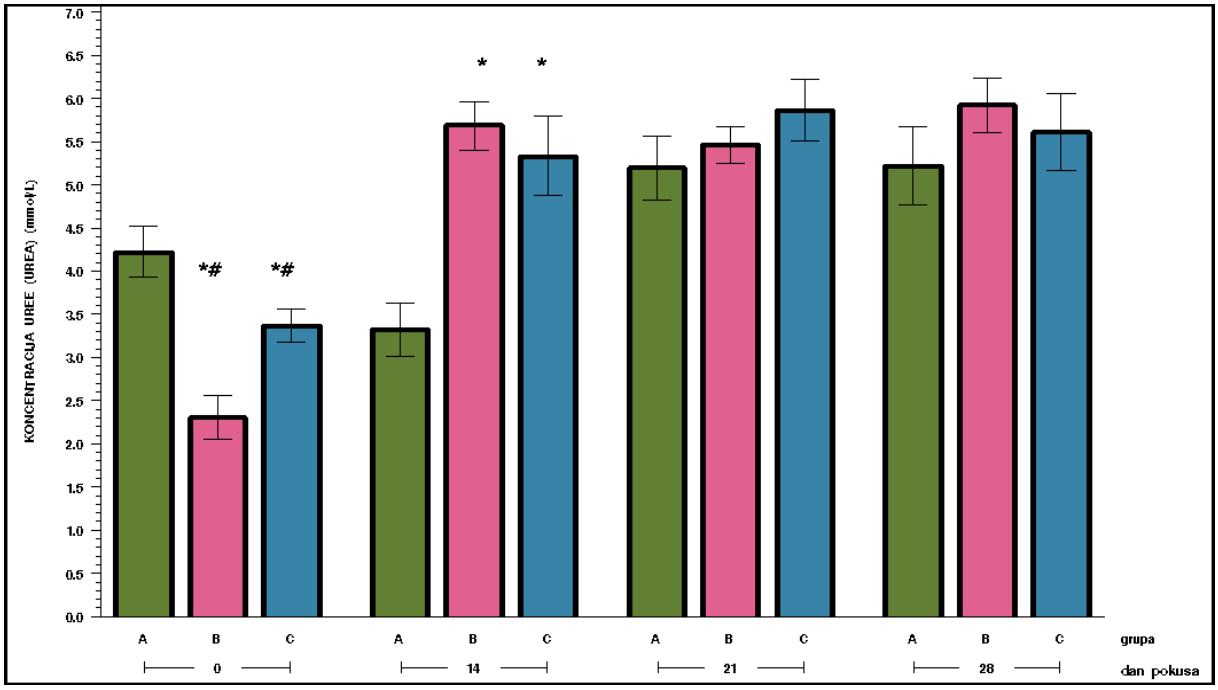
Slika 54. Koncentracija kolesterola (CHOL) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana ustanovili smo statističku značajnost u koncentraciji triglicerida u serumu pokusne prasadi 0. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 74 % više A skupina u odnosu na B i C skupinu). 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 13 % više B i C skupina u odnosu na A skupinu). 28. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 41 % više B i C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 55).



Slika 55. Koncentracija triglicerida (TRIG) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

Tijekom istraživanog perioda od 5 tjedana ustanovili smo statističku značajnost uree u serumu pokusne prasadi 0. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za 47 % više A skupina u odnosu na B skupinu, za 23 % više A skupina u odnosu na C skupinu), te između pokusnih Skupina B i C (za 35 % više C skupina u odnosu na B skupinu). 14. dana pokusa između pokusnih skupina B i C u odnosu na kontrolnu skupinu A (za u prosjeku 35 % više B i C skupina u odnosu na A skupinu) (Slika 56).



Slika 56. Koncentracija uree (UREA) u serumu pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis) (* - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ($p \leq 0,005$); # - statistička značajnost među pokusnim skupinama ($p \leq 0,005$).

5.7. Bakteriološki pokazatelji

Rezultate bakterioloških analiza rektalnih obrisaka za sve skupine prasadi tijekom 5 tjedana trajanja pokusa, obradili smo i prikazali na razini grupnog uzorka (7 prasadi po skupini) i to za 0., 14., 21.,i 42. dan pokusa (Tablica 6). Iz Tablice 6 je vidljivo da su iz rektalnih obrisaka prasadi svih skupina tijekom cijelog pokusa najčešće dobiveni izolati bili nepatogeni i patogeni izolati bakterije *E. coli*. Osim navedenih izolata, tijekom cijelog pokusa, iz uzoraka svih skupina prasadi, izdvojeni su i nepatogeni izolati bakterija *Enterococcus spp.* i *Proteus sp*., koji su dokazani u manjem broju rektalnih obrisaka u odnosu na broj obrisaka pozitivnih na prisutnost izolata *E. coli* i to neovisno o skupini prasadi. Neke od patogenih hemolitičkih izolata bakterije *E. coli* smo serotipizirali na prisutnost OK seroloških grupa i fimbrijskih antigena (F), te utvrdili prisutnost F4 i F5 fimbrija. Ukupno tijekom 5 tjedana trajanja pokusa najviše je prasadi (6) s enterotoksigenom *E. coli* F4+ pronađeno u izolatima C skupine pokusne prasadi. Nadalje, u prasadi iz skupine B u svega jednom uzorku su izolirani hemolitički izolati bakterije *E. coli* posljedično čemu je uginulo samo jedno prase. U svim pokusnim skupinama, nalaz nehemolitičkih izolata bakterije *E. coli* varira od jednog do četiri pozitivna uzorka po danu pokusa .

Tablica 6. Bakterijski izolati iz obrisaka sluznice rektuma (o. r.) pokusne prasadi po pojedinoj skupini, tretiranih (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 35 dana trajanja pokusa, te broj bakterija (CFU/mL) 0. i 28. dana pokusa.

Dan pokusa	**Izolat (o. r.)***	**Kontrola (A)**	**Pripravak plemenite pečurke (B)**	**Nativni propolis (C)**
0.	*E. coli, Enterococcus spp., Proteus sp.*	+	+	
	E. coli (apatogena)	++	++	
	Bacillus cereus, E. coli,Enterococcus spp.			+
	E. coli (apatogena) i *Proteus sp*.		+	
	E. coli i *Enterococcus spp.*	++++	+++	++++
	Enterotoksigena *E. coli* F4+			+
	Enterococcus sp.,Bacillus cereus,			+
	CFU/mL	*** 10^{-7}**	*** 10^{-4}**	/
14.	*E. coli* (apatogena)		++	+
	E. coli (apatogena) + *Enterococcus* spp.	++	++++	+++++
	E. coli, Enterococcus spp., Proteus sp.	+		
	E. coli, Proteus sp.	++	+	
	Enterococcus spp			+
	Bacillus cereus, E. coli	+		
	Proteus sp.	+		
21.	*E. coli* (apatogena)	+	+	++
	Enterococcus sp.	+++	+	
	E. coli (apatogena) + *Enterococcus* spp.	++	++++	
	Enterotoksigena *E. coli* F4+		+	++++
	Enterococcus sp,. Enterotoksigena *E. coli* F4+			+
	Proteus sp.	+		
28.	*E. coli* (apatogena)			+
	Enterococcus sp.		+	++++
	E. coli (apatogena) + *Enterococcus* spp.		+	+
	E. coli, Enterococcus spp., Proteus sp.		+	
	Enterococcus sp., Proteus sp.		+	
	Proteus sp., E. coli (apatogena)		++	
	Bacillus sp., E. coli (apatogena)		+	
	Enterococcus sp., Bacillus sp.			+
	CFU/mL	*** 10^{-8}**	*** 10^{-5}**	*** 10^{-5}**

*porast kolonija do razrjeđenja (CFU/ml)

U jejunumu prasadi iz kontrolne skupine prosječan broj CFU/mL se smanjio 28. dana pokusa u odnosu na 0. dan pokusa što je vidljivo iz Tablice 6. Također se broj bakterija smanjio i i pokusnoj skupini B (pripravak plemenite pečurke) i pokusnoj skupini C u odnosu na 0. dan pokusa, ali je i bitno manji u odnosu na broj bakterija prasadi iz kontrolne skupine na kraju pokusa (10^{-5} CFU/mL).

5.8. Patoanatomski nalaz

Patoanatomski nalazi pri razudbi dva praseta 0. dana pokusa (prase 1, prase 2) i tri praseta 28. dana pokusa (po jedan iz svake pokusne skupine: prase 3 iz skupine A; prase 4 iz skupine B; prase 5 iz skupine C) nisu pokazali bitne makroskopski vidljive patološke promijene (Tablica 7.).

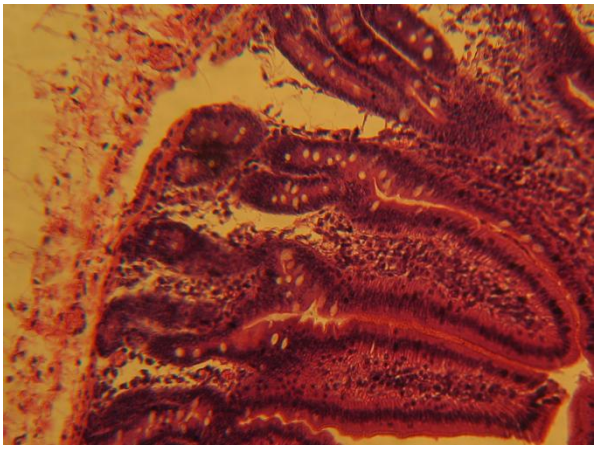
Talica 7. Razudbeni nalazi prasadi žrtvovanih 0. i 28 dana pokusa.

RAZUDBENI NALAZ PRASADI				
Prasad žrtvovana 0. dana pokusa		Prasad žrtvovana 28. dana pokusa		
prasa 1	prasa 2	prase 3	prase 4	prase 5
muškog spola: Nalaz na svim organima – bez osobitosti (b.o.)	ženskog spola: Apostemozna upala predlopatičnog limfnog čvora; nalaz na ostalim organima b.o.	muškog spola: Hiperplastični limfadenitis svih potkožnih i mezenterijalnih limfnih čvorova. Edem i hiperemija pluća. Nalaz na svim ostalim organima b.o	muškog spola: Hiperplastični limfadenitis svih potkožnih i mezenterijalnih limfnih čvorova. Ascites niskog stupnja. Folikularna hiperplazija slezene. Edem i hiperemija pluća. Erozija po žljezdanoj sluznici želuca. b.o	ženskog spola: Edem i hiperemija pluća. Nalaz na svim ostalim organima b.o..

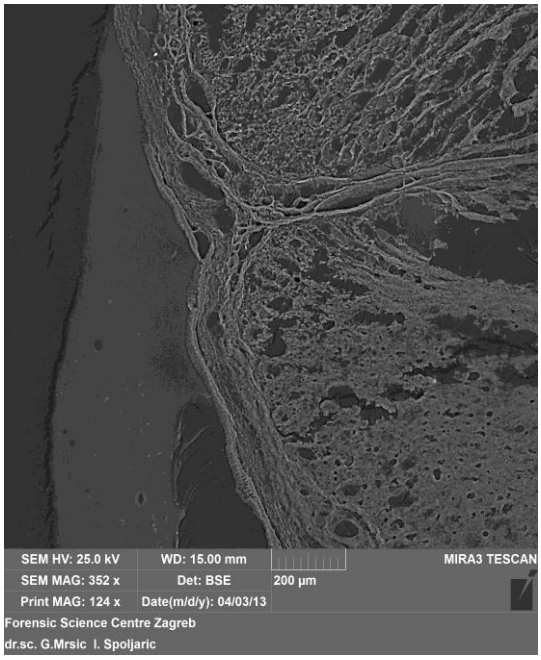
5.9. Patohistološki nalaz

Histopatološke promjene u sluznici jejunuma i u mezenterijskim limfnim čvorovima prasadi u pokusu prikazane su 28. dana pokusa (Slike 57-70).

U jejunumu praseta iz kontrolne skupine 28. dana pokusa vidljivo je vrlo umjereno oštećenje epitela, potom vrlo slabo zadebljanje sluznice i vrlo blaga deskvamacija resica, te blaga infiltracija mononuklearnih leukocita (MNL) i globularnih leukocita (GL) u lamini propriji (LP) (Slika 57-58.).

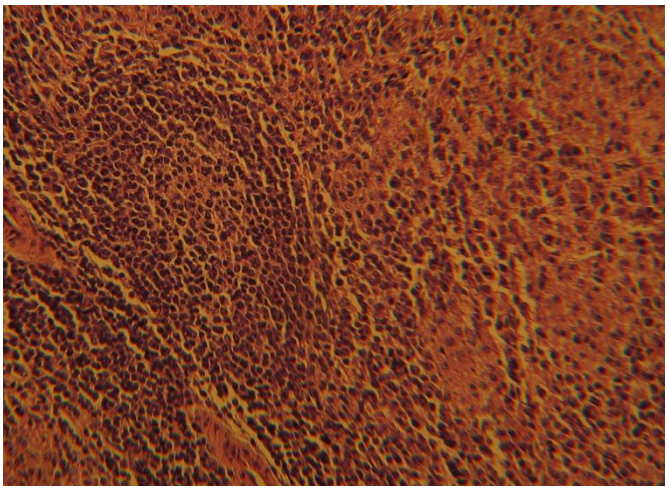


Slika 58. Jejunum praseta iz kontrolne skupine 28. dana pokusa; HE, x (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

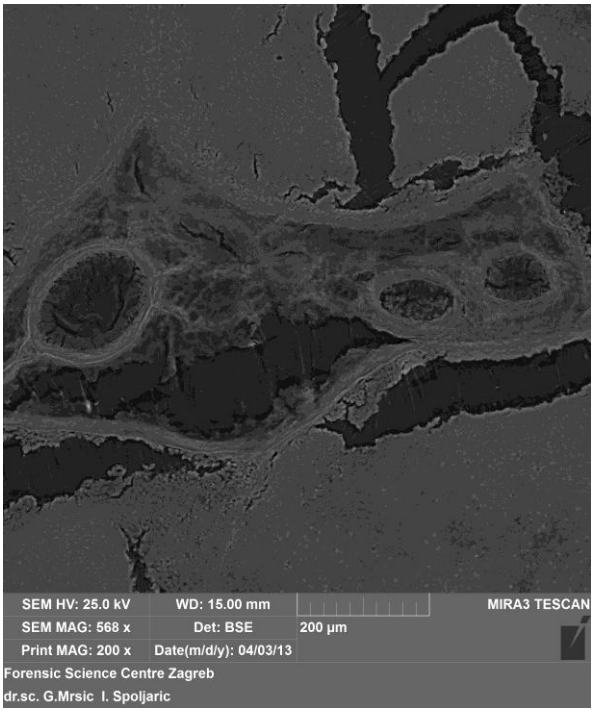


Slika 59. Ultrastruktura jejunuma praseta iz kontolne skupine 28. dana pokusa elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

U mezenterijalnim limfnim čvorovima praseta iz kontrolne skupine 28. dana pokusa vidljiva je blaga difuzna hiperplazija limfocita (Slika 60-61.).

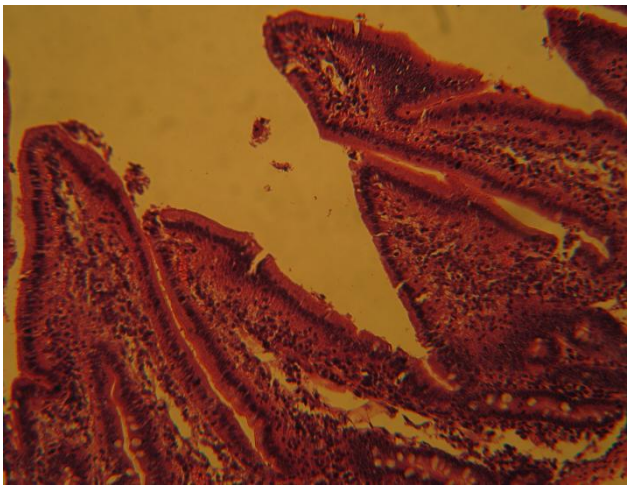


Slika 60. Mezenterijski limfni čvor praseta iz kontrolne skupine 28. dana pokusa; HE, x 200 (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

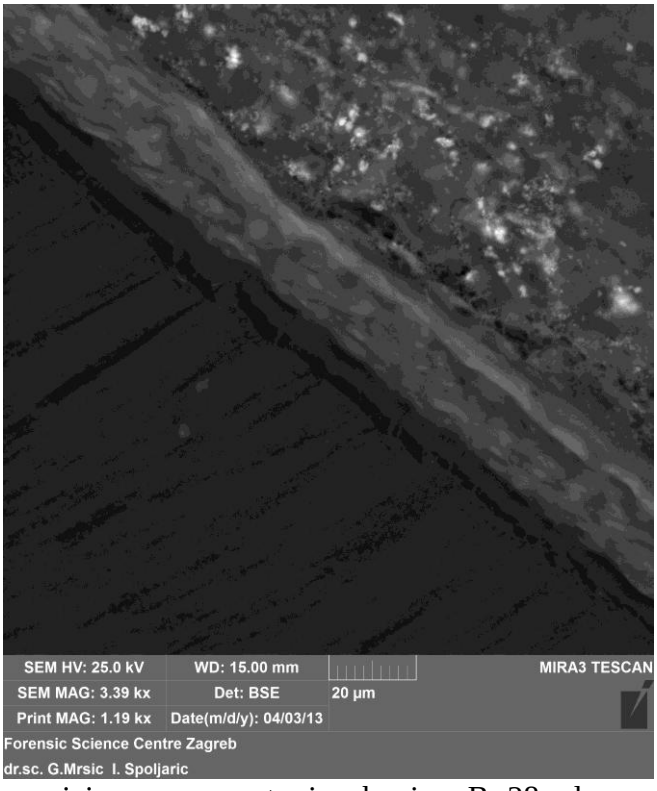


Slika 61. Ultrastruktura mezenhimalnog limfnog čvora 28. dana pokusa praseta iz kontrolne skupine vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

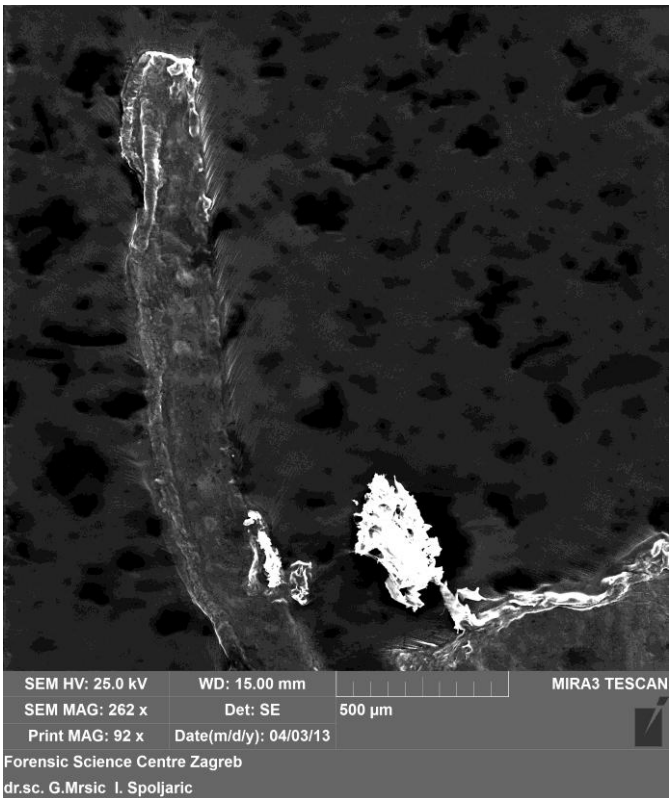
U jejunumu praseta iz skupine B 28. dana pokusa vidljiva je jaka infiltracija lamine proprije sa mononuklearima i manji broj globularnih leukocita te blaga deskvamacija i stapanje pojedinačnih resica (Slika 62-64).



Slika 62. Jejunum praseta iz skupine B 28. dana pokusa; HE, x (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

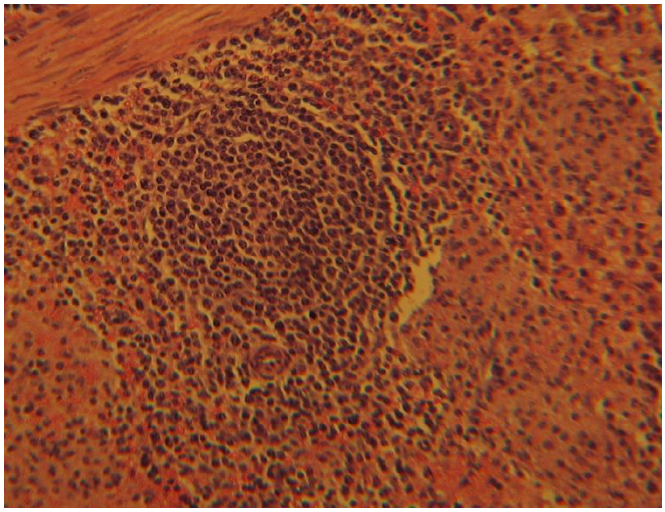


Slika 63. Ultrastruktura jejunuma praseta iz skupine B 28. dana pokusa vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

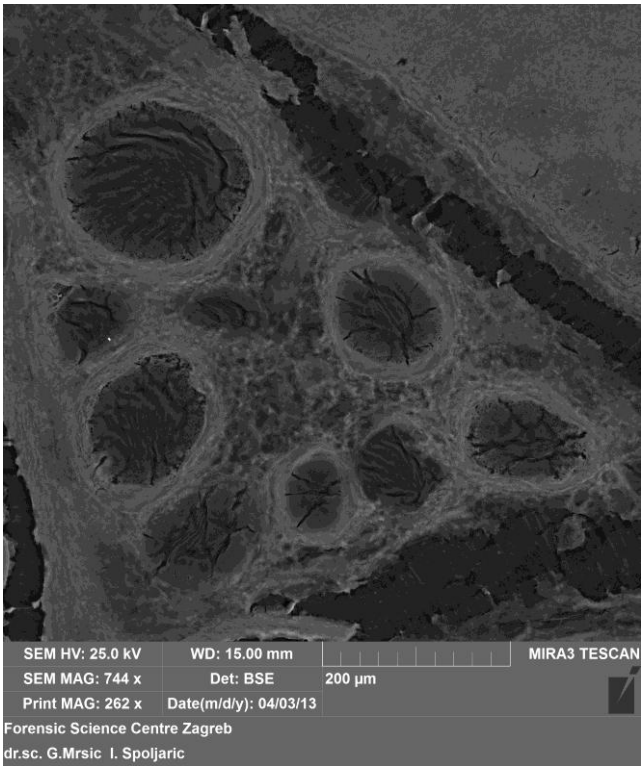


Slika 64. Ultrastruktura resice jejunuma praseta iz skupine B 28. dana pokusa vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

U mezenterijalnim limfnim čvorovima praseta iz skupine B 28. dana pokusa vidljiva je izrazita folikularna hiperplazija lifnog čvora te u srži manji broj globularnih leukocita (Slika 65-66.).



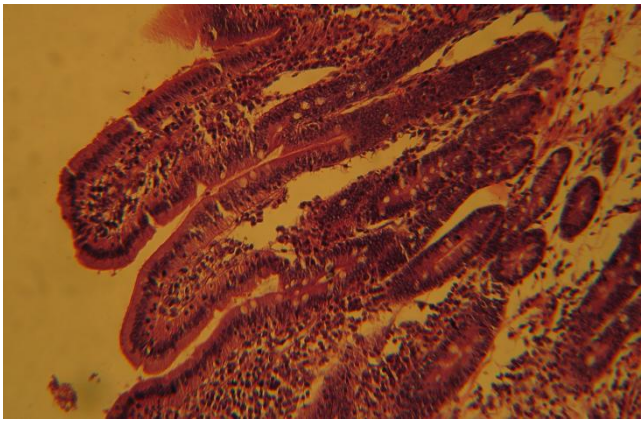
Slika 65. Mezenterijski limfni čvor praseta iz skupine B 28. dana pokusa; HE, x 200 (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).



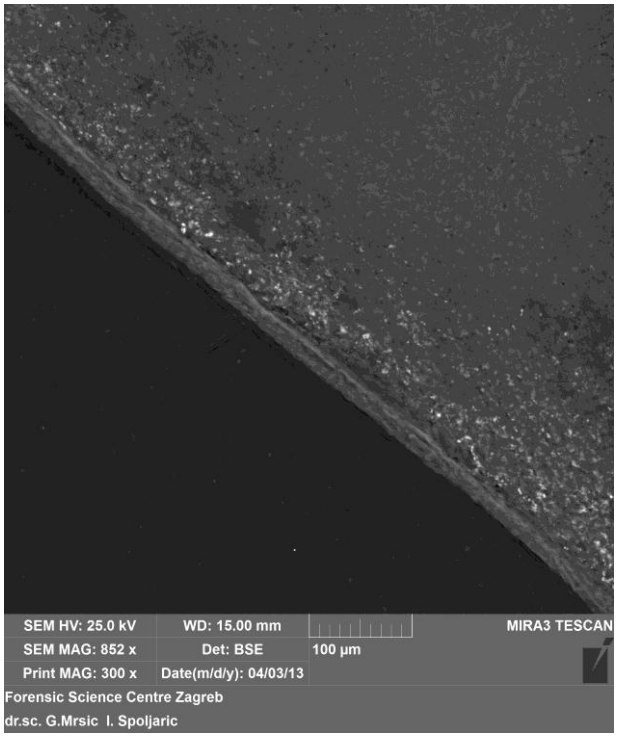
Slika 66. Ultrastruktura mezenhimalnog limfnog čvora praseta iz skupine B 28. dana pokusa vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

.

U jejunumu praseta iz skupine C 28. dana pokusa vidljiv je mononuklearni infiltrat u lamini propriji, te blaga deskvamacija vrha resica s mjestimičnim spajanjem resica (Slika 67-68.).

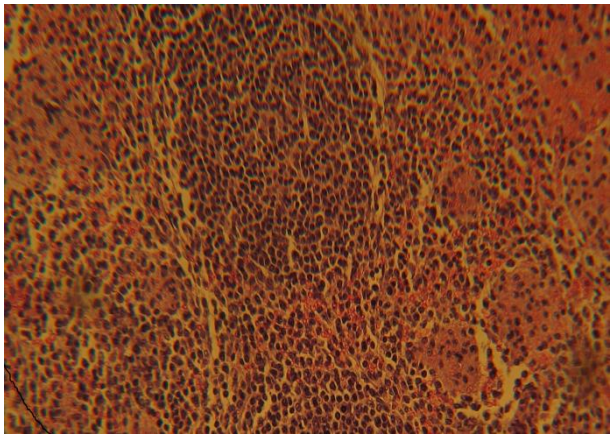


Slika 67. Jejunum praseta iz skupine C 28. dana pokusa; HE, x (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

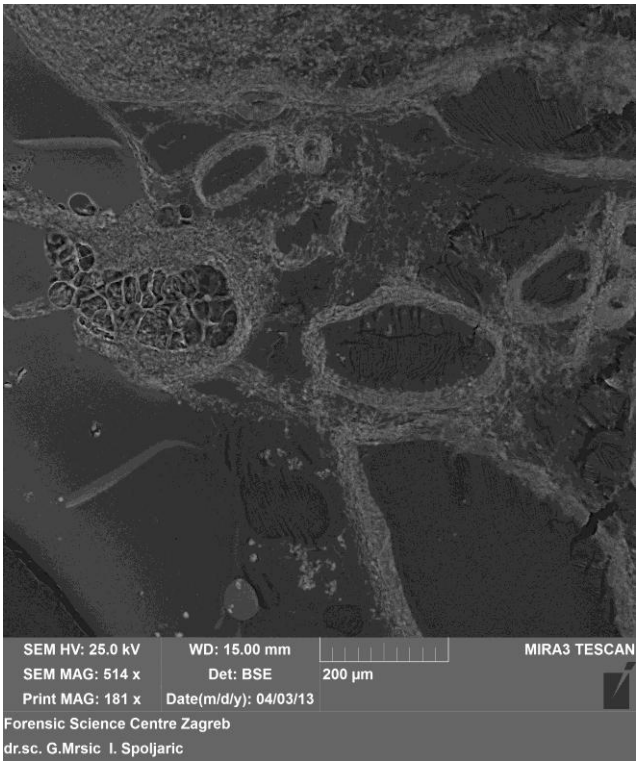


Slika 68. Ultrastruktura jejunuma praseta iz skupine C 28. dana pokusa vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

U mezenterijalnim limfnim čvorovima praseta iz skupine C 28. dana pokusa vidljiva je jača infiltracija limfnog čvora s globularnim leukocitima (Slika 69-70.).



Slika 69. Mezenterijski limfni čvor praseta iz skupine C 28. dana pokusa; HE, x 200 (LEITZ DIALUX 2D ED, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).



Slika 70. Ultrastruktura mezenhimalnog limfnog čvora praseta iz skupine C 28. dana pokusa vizualizirana elektronskim mikroskopom SEM Tescan Mira3 FEG (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska).

5.9. Kemijska analiza mesa

Kemijskom analizom uzorka mesa buta pokusne prasadi nismo uočili odstupanje od referentnih vrijenosti za svinjsko meso (Tablica 8). Meso prasadi skupine B (pripravak plemenite pečurke) sadržavalo je najmanju količinu masti, dok je za meso prasadi skupine C (nativni propolis) vidljiva nešto viša razina kolagena u uzorku.

Tablica 8. Kemijska analiza uzoraka mesa pokusne prasadi tretirane (pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom) tijekom 5 tjedana trajanja pokusa. (A skupina=kontrola; B skupina=pripravak plemenite pečurke; C skupina=nativni propolis)

Skupina	A (kontrola)	B (pripravak plemenite pečurke)	C (nativni propolis)
Voda	78,3	79,5	79,4
Sirove bjelančevine	16,03	16,35	16,34
Kolagen	0,1466/1,17	0,1043/0,83	0,2943/2,35
Ukupni pepeo	1,22	1,15	1,29
Ukupne masti	2,57	2,27	2,66

5.10. Mikroklimatski pokazatelji

Mikroklimatski pokazatelji na svinjogojskoj farmi mjereni 14. dana istraživanja u objektu gdje se odvijao pokus odgovaraja zahtjevima odbijene prasad u pogledu mikroklimatskih uvjeta.

Dobivene su slijedeće vrijednosti:

- Temperatura zraka = 24,5˚C
- Relativna vlaga zraka = 52 %
- Brzina strujanja zraka = 0.1 m/s
- Ugljični dioksid = 900 ppm
- Amonijak = 5 ppm

6. RASPRAVA

Svinjogojska proizvodnja je jedna od najznačajnijih grana poljoprivredne proizvodnje u Hrvatskoj, prisutna u ekstenzivnom (tradicijskom) ili intenzivnom (industrijskom) načinu uzgoja svinja u gotovo svim dijelovima zemlje. Poznato je da je industrijski uzgoj svinja mnoštveni uzgoj, i da su gubici tijekom pojedinih njegovih faza uvijek gospodarski značajni, pa su stoga i sa zdravstvenog, bioetičkog i financijskog aspekta neprihvatljivi. Najznačajniji dio tih gubitaka odnosi se na sisajuću i odbijenu prasad, pa su stoga za te dobne kategorije uvedene preventivne i terapijske mjere suzbijanja (uglavnom antibioticima) perinatalnih infekcija dišnog, a napose probavnog sustava. Premda se zna da profilaktička uporaba antibiotika u uzgoju konzumnih životinja nije idealan pristup, ipak do danas većina farmi temelji preventivu crijevnih infekcija mladunčadi na tom pristupu (NAGY i FEKETE, 1999.). Međutim, mnoge farme primjenjuju tehnologije upravljanja uzgojem koje uključuju sustave „sve unutra, sve van“, vode brigu da nastambe budu čiste i suhe, kao i standarde „dobre farmske prakse“, radi dugoročne preventive kolidijareje. Preventiva i kolidijareje i kolienterotoksemije, temeljena na nasljednoj otpornosti prasadi, premda teoretski moguća, nije čini se praktički rješiva zbog vezanog nasljeđivanja gena za sklonost prema stresu s odsustvom gena za enterocitne receptore za ETEC sojeve (VOGELLI i sur., 1994.). Pristup kojim se otklanjaju činitelji upravljanja uzgojem koji predisponiraju pojavi proljeva u mlade prasadi uključuje odabirno odbiće, temeljeno na dobi i težini prasadi, dijetetsku hranidbu odbijenika, izbjegavanje prenaseljavanja objekata, kao i uporabe objekata kontaminiranih prethodnim naseljavanjem prasadi. Poznato je da hranidba također ima značajnu ulogu u modulaciji prijemljivosti prasadi prema infekcijskim bolestima. Zna se da je nutritivna deficijencija povezana s oslabljenim imunosnim odgovorom na prirodne ili izazivačke infekcija zbog slabljenja stanične imunosti, proizvodnje protutijela i citokina, što dovodi do opće imunodeficijencije (ADAMS, 2004.). Soga je za suvremenu animalnu proizvodnju izuzetno važna spoznaja da nutrienti i nutraceutici mogu modulirati aktivnosti imunosnog sustava. Primjena nutrienata ili nutraceutika radi moduliranja sustavnog i crijevnog imunosnog sustava čini osnovu nutritivne imunologije ili nutritivne imunomodulacije. Ona se definira kao modulacija aktivnosti imunosnog sustava specifičnim nutrientima ili nutraceuticima, koji se dadavaju hrani u količinama iznad uobičajenih za dotičnu smjesu (GRIMBLE, 2001.). Osim toga, nutritivna imunomodulacija može regulirati učinke prekomjerne imunosne aktivacije na inhibiciju rasta. No za sada nisu utvrđene specifične nutritivne potrebe prasadi za optimalnu imunosnu funkciju, koje bi istovremeno zadovoljavale

proizvodnost na gornjoj granici njihova biološkog potencijala (JOHANSON i sur, 2001.). Pri tomu je nužno utvrditi relevantne znanstvene pokazatelje za optimalnu imunosnu i nutritivnu modulaciju otpornosti mlade prasadi prema crijevnim infekcijama, kao što su koidijareja i kolienterotoksemija i preporučiti ih za primjenu u intenzivnoj proizvodnji svinja.

Na osnovi dostupnih literaturnih podataka o biološkim svojstvima plemenite pečurke Agaricus bisporus i nativnog propolisa, u okviru provedenih istraživanja, provjerili smo i definirali njihove moguće probiotske i imunomodulacijske učinak na zdravlje i proizvodnost prasadi i to u dobi od 26 do 51 dana starosti. Naime, brojni literaturni podaci opisuju njihove blagotvorne učinke (GOU i sur., 2003., WILLIS i sur., 2007., WALLACE i sur., 2010., GIANNENAS i sur., 2010.) što je u suglasju i sa u našem radu dobivenim rezultatima. Međutim, dobivene rezultate naših istraživanjima o povoljnim učincima testiranih pripravaka na zdravstvene i proizvodne pokazatelje u prasadi, nismo mogli u potpunosti objektivno vrednovati iz razloga što u dostupnoj nam literaturi nismo našli opisana slična istraživanja. Naime, u našem radu testirani pripravci uglavnom su istraživani na laboratorijskim glodavcima (VETVICKA i sur., 2007., SHEN i sur., 2007., ORŠOLIĆ i sur., 2009.) radi utvrđivanje njihovih potencijala za uporabu u humanoj medicini, dok je njihov imunostimulacijski i proizvodni potencijal nedovoljno, odnosno samo djelomično opisan u veterini (ŠPOLJARIĆ i sur., 2011.).

Stoga, u našim istraživanjima, kao dvije osnovne polazišne točke, koristili smo literaturne podatke o probiotskom i imunostimulacijskom učinku plemenite pečurke na modelu tovnih pilića (MRŠIĆ, 2011.), odnosno propolisa na modelu laboratorijskih miševa (ORŠOLIĆ i sur., 2009.). Tako, pripravak suhe biomase plemenite pečurke nakon umješavanja u komercijalnu hranu za tov pilića u koncentraciji od 10 g/kg pokazao je nutritivni dok u koncentraciji od 20 g/kg imunostimulacijski učinak na piliće u tovu tijekom 38 dana. Flavonoidnim sastavnicama propolisa pripisuje se probiotski i imunostimulacijski učinak propolisa. Međutim, ORŠOLIĆ i sur. (2009.) napominju da intenzitet tih učinaka ovisi o samoj koncentraciji flavonoida u pripravku propolisa koja varira s obzirom na različita geografska područja i biljke koje tamo obitavaju. U našim istraživanjima u stočnu hranu za prasad umješavali smo testirane pripravke točno određenog analitičkog sastava na osnovi kojih smo u pripravku plemenite pečurke zabilježili veći udio bjelančevina što je i rezultiralo njegovim za 15,6% jačim nutritivnim učinkom na kraju istraživačkog razdoblja u odnosu na propolis. Također, analitičkim analizama utvrdili smo da i nativni propolis i pripravak plemenite pečurke sadrže farmakološki bioaktivne tvari kojih su učinci povezani s regulacijom imunosnog sustava (BROWN i GORDON, 2003., AIDA i sur., 2009.). ORŠOLIĆ i sur. (2002.) napominju da se

imunomodulacijska svojstva propolisa i njegovih flavonoidnih sastavnica očituje u aktivaciji makrofaga što je u suglasju s rezultatima dobivenim u ovom radu. Naime, u prasadi hranjenih uz dodatak propolisa na kraju istraživačkog razdoblja zabilježili smo za 10 % jaču aktivaciju makrofaga u odnosu na svinje iz kontrolne skupine. Nadalje, aktiviranim makrofazima je povećana fagocitna aktivnost, sposobnost razgradnje fagocitnih tvari i sposobnost prezentiranja antigena pomoćnićkih T limfocita. Također i mehanizmi djelovanja bioaktivnih molekula gljiva donekle su poznati, a temelje se na vezanju α-manana za manozu na membrani limfoidnih i mijeloidnih stanica (TZIANABOS, 2000.), dok se β-D-glukani vežu za receptore na površini makrofaga, neutrofila, NK-stanica, T-limfocita, dendritičkih stanica, fibroblasta i endotelnih stanica i mijenjanju njihove imunosne i metaboličke aktivnosti (BROWN i GORDON, 2003., HERRE i sur., 2004.). Zanimljiv je i mehanizam djelovanja lektina izdvojenog iz plemenite pečurke (ABL-lektin), koji se u in vitro uvjetima veže za specifične receptore na membrani mišjih T limfocita i potiće aktivnost unutarstanične protein tirozin kinaze, enzima koji potom aktivira CD25+ i CD69+ rane aktivacijske biljege T limfocita (HO i sur., 2004.). S obzirom da u dostupnoj literaturi nema podataka o učincima pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa na kinetiku promjena udjela CD45+, CD4+, CD8+ i CD21+ limfoidnih stanica periferne krvi prasadi u tovu, nismo mogli uspoređivati naše podatke niti u potpunosti vrednovati njihov objektivni značaj. Međutim, rezultati su indikativni i ukazuju na značajno, podjednakog intenziteta, imunostimulacijsko djelovanje pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa dodanih u hranu za prasad. Stoga smatramo da je utvrđeni imunostimulacijski učinak pripravaka na udjel limfoidnih stanica periferne krvi prasadi prvi takav podatak u nas, i vjerojatno jedan od prvih podataka te vrste u svijetu. Naime, na kraju pokusa prasad koja je bila hranjena s dodatkom istraživanih pripravka u perifernoj krvi imala je veći udjel limfoidnih stanica u usporedbi s prasadi iz kontrolne skupine i to u prosjeku za: 14,3 % CD45+, 26 % CD4+ , 20 % CD8+, 23,3% CD4+CD8 i 11,2 % CD21+. Dobiveni rezultati mogli bi poslužiti kao model za nespecifičnu imunoprofilaksu u intenzivnoj svinjogojskoj proizvodnji uporabom tvari, poput pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa, koje imaju osobitosti i nutraceuitika i imunomodulatora, a ti bi rezultati mogli biti značajni i u širem kontekstu preventivne veterinarske medicine i animalne proizvodnje. Naime, poznato je da u životinja uspostavljanje jačeg i trajnijeg imunosnog odgovora, može umanjiti prirast, iskorištavanje hrane i reprodukcijski potencijal životinje što uzrokuje velike gubitke u proizvodnosti (VERDONCK i sur., 2008.) što nije u suglasju sa našim rezultatima, jer su svinje hranjene uz dodatak ispitivanih pripravaka imale na kraju pokusa veću tjelesnu masu u odnosu na kontrolne svinje

za u prosjeku 8%. Nadalje, njihovo opće zdravstveno stanje procijenili smo i praćenjem vrijednosti pojedinih istraživanih hematoloških i biokemijskih parametara. Većina promjena bila je unutar fizioloških vrijednosti za svinja u tovu, što ukazuje da testirani pripravci nisu uzrokovali nuspojave. Na osnovi nam dostupnih literaturnih podataka, napominjemo da sličnih istraživanja ima s nizom imunobiotika/nutraceutika, ali drugog podrijetla i/ili formulacije. Međutim, ta istraživanja, za razliku od naših, nisu polučila zadovoljavajuće rezultate, niti su dala praktična rješenja. Stanje umijeća glede rješavanja zdravstvenih problema vezanih za gubitke od ETEC infekcija u odbijene prasadi ne nudi ni patentibilna cjepiva protiv kolidijareje/kolienterotoksemije. Naime, postoje brojni znanstveni radovi, ali su njihovi rezultati često nekonzistentni i nereproducibilni, napose glede standardizacije učinaka vakcinalnih pripravaka, pa stoga nisu trenutno podloga za testiranje praktičnih proizvoda/rješenja u području preventive/kontrole crijevnih infekcija bakterijske etiologije u prasadi. Nadalje, na osnovi rezultata bakterioloških pretraga obrisaka sluznica rektuma prasadi hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke i propolisa tijekom cijelog pokusa nije dokazana prisutnost patogenog soja bakterije E. coli niti bakterije Salmonele sp. čemu u prilog govori i kliničkivrlo blagi izražaj proljeva tijekom cijelog pokusa. Dobiveni rezultati u suglasju su s literaturnim podacima. Naime, ORŠOLIĆ i sur. (2009.) opisali su protubakterijsku i protugljivičnu aktivnost propolisa i to za: *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Staphylococcal i Sreptococcal sp., Corynebacterium, Escherichia coli 026, Escherichia coli 0111, Klebsiella ozaenae, Salmonella choleraesuis, Salmonella enteritidis, Salmonella typhosa, Salmonella dublin, Salmonella gallinarum, Salmonella pullorum, Shigella dysenteriae, Shigella sonnei, Proteus vulgaris, Mycobacterium, Bacillus alvei, Bacillus larvae, Bacillus mesentericus, Bacillus subtilis, Micosporum audomii, Micosporum canis, Micosporum cookei, Micosporum distortum, Micosporum ferrugineum, Micosporum gypseum, Trichophyton ferrugineum, Trichophyton schoenleim, Trichophyton schoenlemi, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum*, i druge. OZTUIK i sur. (2011.) u svojim istraživanjima također su opisali i jaki antibakterijski učinak pripravaka gljiva roda *Agaricus* na Gram (+) bakterije i to posebice na bakterije *Micrococcus luteus, Micrococococcus flavus i Bacilus subtil*is. U našim istraživanjima, u obriscima rektuma sluznice prasadi hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa već nakon dva tjedna hranjenja smanjen je broj *Enterobacterioceae*. MRŠIĆ (2011.) je u svojim istraživanjima pokazao da pripravak *Agaricus bispor*us dodan u komercijalnu hranu u koncentraciji od 20 g/kg u obriscima sluznice rektuma pilića podiže broj bakterije *Lactobacillus sp*. za u prosjeku od 14,6 % u odnosu na piliće iz kontrole. U našim pokusima

nismo analizirali utjecaj plemenite pečurke i nativnog propolisa na rast bakterije *Lactobacillus sp.* Opisani rezultati bakterioloških analiza u našim pokusima, osim što su pokazatelji, odnosno indikatori za procjenu općeg zdravstvenog stanja i zdravlja probavnog sustava prasadi, mogu se promatrati i u kontekstu zajedno sa histopatološkim pokazateljima. Pripravci nativnog propolisa i plemenite pečurke zaštitili su sluznicu tankog crijeva u odnosu na sluznicu prasadi hranjenih bez dodatka testiranih pripravaka. Dokaz bolje stanične imunosne zaštite crijeva prasadi hranjenih uz dodatak propolisa i/ili plemenite pečurke jest činjenica da je sluznica jejunuma i ileuma bila nešto manje zadebljala, s opsežnijim infiltratom limfoidnih i mijeloidnih stanica od sluznice prasadi hranjenih komercijalnom hranom. Rezultate slične našima, opisali su MRŠIĆ i sur. (2013.), ali na modelu pilića hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke. Nadalje, u našim istraživanjima, u prasadi hranjenih 28 dana uz dodatak pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa patoanatomski nalazi pri razudbi nisu pokazali nikakve makroskopski vidljive patološke promijene. Također, niti histopatološke promjene sluznice tankog i debelog crijeva prasadi hranjene uz dodatak pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa nisu se znatnije razlikovale od prasadi hranjenih samo komercijalnom hranom, te se mogu okarakterizirati blagim oštećenjima crijevnih resica, umjerenom infiltracijom mononuklearnih leukocita, znatnom proliferacijom/hiperplazijom dispergiranih limfocita i globularnih leukocita u lamini propriji, njihovih većih nakupina (solitarni limfni čvorovi) u mukozi i submukozi, odnosno limfoidnih i mijeloidnih stanica u agregiranim limfatičkim tkivima. Opisani patoanatomski i histopataloški nalazi u okviru naših istraživanja u suglasju su s literaturnim podacima koje su opisali GIANNENAS i sur. (2010.). Shodno tome, i u našim istraživanjima niti meso svinja hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa nije imalo bitno promijenjen kemijski sastav u odnosu na meso 5 tjedana starih svinja hranjenih komercijalnom hranom (LESIOW, 2009.). Tako na osnovi udjela vode, bjelančevina, masti i pepela u mesu pokusnih svinja možemo zaključiti da se ono odlikuje niskom energetskom vrijednosti te se kao takvim može smatrati povoljnim dijetetskim proizvodom namijenjenim za ljudsku prehranu što je u suglasju s KRALIK i sur. (2008.). Naime, znatni se napori ulažu u razumijevanje crijevnih infekcijskih bolesti, njihove dijagnoze, uključujući i biologiju uzročnika, otpornosti domaćina i liječenja u intenzivnoj mnoštvenoj proizvodnji svinja. Naprotiv, malo se zna o preventivi tih bolesti s pomoću imunomodulacijskih i nutritivnih strategija, jer su ti problemi do sada bili rješavani dodavanjem subterapijskih doza antibiotskih promotora rasta u hranu u svinjogojskoj industriji. Tako su antibiotski promotori rasta korišteni za unapređivanje rasta, ali i za kontrolu crijevnih infekcija tijekom kritičnih

razdoblja kao što je odbiće prasadi. Bojazan od mogućeg rizika po ljudsko zdravlje zbog uporabe i/ili zlouporabe antibiotskih promotora rasta u hrani za svinje, dovela je do zabrane njihove uporabe u zemljama EU (propis EK broj 1831/2003). Radi prilagođavanja na povlačenje antibiotskih promotora rasta iz uporabe (u EU od 2006. godine), sada postaje nužno i za Hrvatsku, kao zemlju članicu EU od 01.07.2013. godine, da prihvati nadolazeće propise EU te da se priključi europskim znanstvenim trendovima u veterinarskoj medicini u cilju utvrđivanja relevantnih zdravstvenih kriterija, napose probavnog sustava, kao i znanstveno utemeljenih preporuka za uporabu alternativa antibiotskim poticatelja rasta u hrani. Naime, od 2006. godine, Europske upute ograničavaju nekliničku uporabu antibiotskih poticatelja rasta u proizvodnji životinja namijenjenih ljudskoj prehrani. Primjerice, prasad s diarejom izazvanom ETEC sojevima liječila se oralnim (neomicin, kolistin, aminozidin, kanamicin, i polimiksin) i/ili parenteralnim (ampicilin, kvinolonii fluorokvinoloni) davanjem antibiotika. Međutim, zadnjih desetak godina neki su antibiotici (kloramfenikol i nitrofurani) uklonjeni s tržišta zbog trajnog hazarda za zdravlje čovjeka ili zbog razvitka rezistencije među uzročnicima bolesti u čovjeka, konzumenta svinjskog mesa, ali i zbog rizika od zagađivanja okoliša. Početna iskustva s napuštanjem uporabe antibiotskih poticatelja rasta u intenzivnoj svinjogojskoj proizvodnji u EU i SAD pokazala su da postoje problemi kao što su pad proizvodnosti, porast morbiditeta/konverzije hrane i povećana učestalost probavnih poremetnji zbog tzv. „disbakterioza"i/ili infekcija enterobakterijama. Tako, jedan od prvih pokušaja neantibiotskih i neimunosnih preventivnih pristupa za kontrolu crijevnih infekcija mlade prasadi temeljio se na dodavanju organskih kiselina (THOMLINSON i LAWRENCE, 1981.) ili probiotika u vodu za piće ili hranu (MAXWELL i STEWART, 1995., JIN i sur., 2000., KIERS i sur., 2002.), što nije polučilo dobre rezultate, odnosno u suprotnosti je sa rezultatima dobivenim u ovom. Naime, od 1980-tih pojavljuju se zanimljiva izvješća o brojnim prirodnim ili sintetičkim tvarima koje mogu uspostaviti oštećenu imunosnu funkciju ili pak pojačati nespecifičnu i specifičnu imunost u domaćih životinja, pa stoga djeluju kao imunomodulatori (BLECHA i CHARLEY, 1990., VALPOTIĆ, 2000.) što je u suglasju i s rezultatima naših istraživanja. Naime, utvrđeni nutritivni i imunomodulacijski učinci pripravka plemenite gljive *Agaricus bisporus* i nativnog propolisa indikativani su pokazatelji opravdanosti umješavanja te gljiva, u krmne smjese u intenzivnom uzgoju prasadi u dobi od 26 do 51 dana starost. Tako, svi u našem radu dobiveni rezultati govore u prilog opravdanosti vrednovanja nativnih pripravaka ili bioaktivnih molekularnih sastavnica plemenite pečurke i nativnog propolisa (ali i drugih vrsta gljiva i biljaka koje sadrže bioaktivne molekule) radi eventualne primjene kao prirodnih tvari s nutritivnim i imunomodulacijskim osobitostima pri

sastavljanju receptura hrane bez uobičajeno dodavanih antibiotskih poticatelja rasta. Naime, prirodno izbalansirana hranidba koja se može optimizirati uporabom prirodnih dodataka hrani (prebiotika, probiotika i imunomodulatora) koji kao nutraceutici mogu u potpunosti zamijeniti sintetske dodatke, pa i antibiotske poticatelje rasta, i zadovoljiti fiziološke potrebe životinja, nakon provjere u pokusima u simuliranim uvjetima te u terenskim (farmskim) pokusima, a bez posljedica po konzumente i okoliš (CHANG i BUSWELL, 1996., BARROS i sur., 2008., GALLOIS i sur., 2009., AIDA i sur., 2009., VALPOTIĆ, 2009., WANI i sur., 2010.). Stoga se danas intenzivna proizvodnja životinja namijenjenih ljudskoj prehrani (napose svinja) ne bi smjela odvijati bez nutraceutika i imunomodulatora dodanih u hrani, koji osim što time postaju sastojci hrane, imaju ujedno i povoljan utjecaj na zdravlje, kako u preventivi, tako i u terapiji bolesti. Predmnijeva se da takve tvari podrijetlom iz plemenite pečurke i nativnog propolisa djeluju u svinja: kompetitivno (prema štetnim tvarima i/ili uzročnicima probavnih infekcija), imunomodulacijski (na stanične i molekularne sastavnice urođene i stečene crijevne i sustavne imunosti), te da pospješuju probavljivosti nutrijenata (KLASING, 2007., BARROS i sur., 2008., WANI i sur, 2010.).

7. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata izveli smo zaključke glede utjecaja pripravka plemenite pečurke i nativnog propolisa na istraživane pokazatelje u odbijene prasadi koje smo, shodno naslovu teze, grupirali kao proizvodne, imunosne i zdravstvene. Zbog množine podataka, u svakoj ćemo grupi pokazatelja iznijet samo utjecaj onih među istraživanim pripravcima na obrađenu prasad, koji se kvalitativno i kvantitativno razlikuje od vrijednosti zabilježenih u kontrolne netretirane prasadi.

1. Proizvodni pokazatelji

U prasadi obrađenih pripravkom plemenite pečurke zabilježeno je:

- najveća prosječna tjelesna masa na kraju istraživanog razdoblja,
- najveći prirast tjelesne mase u odnosu na 0. dan, i u odnosu na neobrađenu prasad.

Nešto slabije proizvodne rezultate polučila je prasad obrađena nativnim propolisom.

2. Imunosni pokazatelji

U prasadi obrađenih pripravkom plemenite pečurke ili nativnim propolisom na kraju pokusa zabilježen je:

- jednakodjelotvoran imunomodulacijski učinak ispitivanih pripravaka.

U prasadi obrađenih nativnim propolisom zabilježen je:

- na kraju pokusa u perifernoj krvi veći broj leukocita,
- sedam dana ranije porast udjela $CD45^+$, $CD4^+$, $CD\ 8^+$ limfoidnih stanica u perifernij krvi,
- na kraju pokusa veći stupanj fagocitoze (ingestije) i mikrobicidnosti (digestije) monocita i granulocita periferne krvi

U prasadi obrađenih pripravkom plemenite pečurke zabilježen je:

- na kraju pokusa u perifernoj krvi veći broj limfocita,
- sedam dana raniji porast udjela $CD4^+$ $CD8^+$ T limfocita, i B limfocita

3. Zdravstveni pokazatelji

Pojavnost i jačinu crijevnih infekcija pratili smo dnevno tijekom trajanja pokusa, i utvrdili:

- nižu pojavnost i jačinu proljeva u prasadi obrađene nativnim propolisom,
- znatno manja uginuća u prasadi obrađena pripravkom plemenite pečurke.

Premda su ovi pokazatelji indikativni za procjenu zdravlja probavnog sustava, moraju se promatrati u kontekstu s bakteriološkim i histopatološkim pokazateljima:

- na kraju pokusa neobrađena prasad imala znatno veći broj CFU/mL sadržaja jejunuma od obrađene prasadi, pri čemu su oba ispitivana pripravka bila jednako učinkovita.
- međutim, tijekom 5 tjedana trajanja pokusa najviše je prasadi (6) s enterotoksigenom *E. coli* F4+ pronađeno u izolatima skupine pokusne prasadi obrađene nativnim propolisom, dok je u prasadi obrađene pripravkom plemenite pečurke u svega jednom uzorku izoliran hemolitički izolati bakterije *E. coli* posljedično čemu je i uginulo samo jedno prase.
- sluznica jejunuma obrađene prasadi bila je manje zadebljana, i s opsežnijim infiltratom limfoidnih i mjeloidnih stanica od one u neobrađene prasadi,
- staničnost mezenterijalnih limfnih čvorova bila je povećana u prasadi obrađene pokusnim pripravcima u odnosu na neobrađenu prasad.

Opće zdravstveno stanje pokusne prasadi procijenili smo, osim dnevnim kliničkim pregledom i tjednom hematološkom i biokemijskom pretragom, i utvrdili da:

- niti jedan od pokusnih pripravaka nije znatnije utjecao na hemogram i eritrocitne konstante, što pokazuje da nisu izazvali štetne popratne pojave,
- niti jedan od pokusnih pripravaka nije znatnije utjecao na konstante biokemijskih parametara.

S obzirom na brojnost u ovom radu istraživanih pokazatelja i množinu podataka dobivenih u ovom kontroliranom *in vivo* pokusu, stekli smo dobar uvid, kako u potencijale, tako i u ograničenja istraživanih pripravaka plemenite pečurke i nativnog propolisa kao prirodnih alterantiva antibiotskim poticateljima rasta u stočnoj hrani. Slijedom navedenoga, izvodimo konačni zaključak da je pripravak plemenite pečurke umješan u komercijalnu hranu za

odbijenu prasad djelotvoran i nutraceutik i imunomodulator, za razliku od nativnog propolis za kojeg smo utvrdili samo imunomodulacijki učinak.

8. POPIS LITERATURE

1. ABRAMSON, S., H. EDELSON, H. KAPLAN, R. LUDEWIG, G. WEISSMAN (1984.): Inhibition of neutrophil activity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A. J. Med. 77, 3-6.
2. ADAMS, C. A (2004): Total nutrition: Feeding animals for health and growth. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 129-156.
3. AIDA, F.M.N.A., M. SHUHAIMI, M. YAZID, A.G. MAARUF (2009): Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci. Tech. 20, 567-575.
4. ARTURSSON, K., M. LINDERSSON, P. WALLGREN (1992): A study of the interferon-production in newborn piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 35, 114-115.
5. BARBISON, L. F., M. MIYAMOTO, C. SCOLASTICI, D. M.F. SALVADORI, L. R. RIBEIRO, A. F. EIRA (2002): Influence of aqueous extract of Agaricus blazei on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. J. Ethnopharmacol. 83, 25-32.
6. BARROS, L., T. CRUZ, P. BAPTISTA, L.M. ESTEVINHO, I.C. FERREIRA (2008): Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food Chem. Toxicol. 46, 2742-2747.
7. BLECHA, F., B. CHARLEY (1990): Rationale for using immunoptentiators in domestic food animals. U: F. Blecha i B. Charley (ur.) Immunomodulation in domestic food animals. str. 3-19, Academic Press, San Diego, CA, USA.
8. BROWN, G.D., S. GORDON (2003): Fungal β-glucans and mammalian immunity. Immunity 19, 311- 315.
9. BEVERLY, P. C. L. (1997): Vaccine immunity. Immunol. Today. 18, 113-115.
10. BINNS R. M. (1982): Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 3, 95-146.
11. BINNS, R. M. (1994): The null/γδTCR^{+} T cell family in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 69-77.
12. BOŽIĆ, F., G. LACKOVIĆ, A. PREVENDAR CRNIĆ, D. SAKAR, I. VALPOTIĆ (2003): Levamisole stimulates intestinal T-cell mediated immune

responses weaned pigs to vaccination against colibacillosis. Journal of veterinary pharmacology and Therapeutics. 26, 229-230.

13. BUTLER, J. E., W. R. BROWN (1994): The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 5-12.
14. CHANG, S.T., J.A. BUSWELL (1996): Mushroom nutriceuticals. World J. Microbiol. Biotechnol. 12, 473-476.
15. COFFEY, M. T., D. W. PILKINGTON (1989): Effect of feeding Zeolite-A on the performance and carcass quality of swine. Journal of Animal Science 67 (Supplement 2), 36, abstract.
16. CURTIS, J., F. J. BOURNE (1971): Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. Biochem. Biophys. Acta 236, 319-332.
17. DABA, A.S., O.U EZERONYE, (2003): Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. Afr. J. Biotecnol. 2, 672-679.
18. DACKO, J., M. WEINER, J. OSEK (2004): Classifying Escherichia coli strains isolated from piglets diagnosed with diarrhoea throught amplifying virulence marcers with PCR. Med. Wet. 60, 952-957.
19. DENHAM, S., M. SHIMIZU, A. T. J. BIANCHI, R. J. ZWART, M. M. CARR, R. M. E. PARKHOUSE (1994): Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 259-267.
20. DUBOST, N.J. (2007): Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chem. 105, 727-735.
21. EICHER, S. D., C. A. McKEE, J. A. CARROLL, E. A. PAJOR (2006): Supplemental vitamin C and yeast cell wall β-glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after ban endotoxin challenge after weaning. J. Anim. Sci. 84, 2352-2360.
22. ELMASTAS, M. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. J. Food Compos. Anal. 20, 337-345.
23. FREITAS, J. A., N. VANAT, J. W. PINHEIRO, M. R. S. BALARIN, J. M. SFORCIN, E. J. VENANCIO (2011): The effects of propilis on antibody production by laying hens. Poultry Sci. 90, 1227-1233.

24. GALLOIS, M., H. J. ROTHKŐTTER, M. BAILEY, C. R. STOKES, I. P. OSWALD (2009): Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role?. Animal 3, 1644-1661.
25. GIANNENAS, I., D. TONTIS, E. ISHAKE (2010): Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. Res. Vet. Sci., 89, 21-28.
26. GUO, F.C., H.F.J. SAVELKOUL, R.P. KWAKKEL, B.A. WILLIAMS, M.W.A. VERSTEGEN (2003): Immunoactive, medicinal properties of mushroom and herb polysaccarides and their potential use in chicken diets. World Poultry Sci. J. 59, 427-440.
27. HERRE, J., S. GORDON, G.D. BROWN (2004): Dectin-1 and its role in the recognition of β-glucans by macrophages. Mol. Immunol. 40, 869-876.
28. HO, J.C.K., S.C.W. SZE, W.Z. SHEN, W.K. LIU (2004): Mitogenic activity of edible mushroom lectins. Biochim. Biophys. Acta 1671, 9-17.
29. HOSKINSON, C. D., B. P. CHEW, T. S. WONG (1990): Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglet. J. Anim. Sci. 68, 2471.
30. EZEKOWITZ, R. A. B., S. GORDON (1984): Alternation of surface by macrophage activation. Expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. U: Adams DO, hanna MG (ur) Macrophage activation. Plenum Press, New York, 33-56.
31. FORTES, R.C., V.C. TAVEIRA, M.R. CARVALHO GARBI NOVAES (2006) The immunomodulator role of β-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. Rev. Bras. Nutr. Clin. 21, 163-168.
32. HAMPSON, D. J., J. R. PLUSKE, D. W. PETHICK (2001): Dietary control of enteric diseases. U: Proceedings of the 8th Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Swedish University of Uppsala, Sweden.
33. HAVERSON, K., A. SAALMŬLLER, B. ALVAREZ, F. ALONSO, M. BAILEY, A. T. J. BIANCHI, W. J. A. BOERSMA, Z. CHEN, W. C. DAVIS (2001): Overview of the third international workshop on swine ltukocyte differentiation antigens. Vet. Immunol. Immunopathol. 80, 5-23.
34. HUH, N. D., Y. B. KIM, H. S. KOREN, D. B. AMOS (1981): Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity in specific-pathogen-free miniature

swine and germ-free piglets.II. Ontogenic development of NK i ADCC. Int. J. Cancer 28, 175-178.

35. JEONG, S.C. Y.T. JEONG, B.K. YANG, R. ISLAM, S.R. KOYYALAMUDI, G. PANG, K.Y. CHO, C.H. SONG (2010): White button (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterimic rats. Nutr. Res. 30, 49-56.
36. JOHNSON, R. W., J. ESCOBAR, D. M. WEBEL (2001): Nutrition and immunology of swine. U: Swine nutrition, 2nd ed., (Lewis, A. J., L. L. Southern, Ur.), CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, pp. 545- 562.
37. JOSIPOVIĆ, P., N. ORŠOLIĆ (2008): Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. 59 , 4, 299-308.
38. KANEKO, J., J. W. HARVEY, M. L. BRUSS (1997): Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed., Academic Press, San Diego, CA, SAD, pp. 890-894.
39. KOGAN, G., A KOCHER (2007): Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. Livestock Sci. 109, 161-165.
40. KOON, H. W., C. POTHOULAKIS (2006): Immunomodulatory Properties of Substance P. The Gastrointestinal System as a Model. Neuroendocrine and Immune Crosstalk. Ann. NY Acad. Sci. 1088, 23-40.
41. KOVARIK, J., C. A. SIEGRIST (1998): Immunity in early life. Immunol. Today 19, 150-152.
42. KOVŠCA-JANJATOVIĆ, A. (2009): Imunohistokemijska i morfometrijska analiza crijevnog imunosnog sustava svinje tijekom perinatalne ontogeneze i nakon egzogene imunomodulacije. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
43. KRALIK G., E. HAS-SCHOT, D. KRALIK, M. ŠPERANDA (2008): Peradarstvo: Biološki i zootehnički principi. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Osijeku, Osijek.
44. LaBONNARDIERE, C., F. LEFEVRE, B. CHARLEY (1994): Interferon response in pigs: molecular and biological aspects. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 29-36.
45. LEONARD, S. G., T. SWEENEY, B. BAHAR; B. P. LYNCH, J. V. O'DOHERTY (2010): Effect of maternal fish oil and seaweed extract

supplementation on colostrum and milk composition, humoral immune response, and performance of suckled pigs. J. Anim. Sci. 88, 2988-2997.

46. LESIOW, T., T. SZMANKO, M. KORZENIOVSKA, L. BOBAK., M. OZIEMBLOWSKI (2009): Influence oft he season oft he year on some technical parameters and ultrastructure of PSE, normal and DFD chicken breast muscles. Proceedings XIX. European Symposium of the quality of Poultry Meat, June 2009, Turku, Finnland, 21-25.
47. LI, J., J.J.ZING, D. F. LI, X. WANG, L. ZHAO, S. LV, D. HUANG (2005): Effects of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae on humoral and cellular immunity in weaned pigs. Arch. Anim. Nutr.m59, 303-312.
48. MA, X., Z. H. GOU; Z. Q. SHEN, J. L. WANG, Y. L. HU, D. Y. WANG (2011): The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig. Cellular Immunol. 270, 13-18.
49. MANOLOVA, N., V. MAXIMOVA, Z. MANOLOVA, I. STOILOVA, E. KORCZAK, A. DENIS (1987): Immunobiological effect of propolis, I. Effect on cellular immunity. Acta Microbiol. Bulg.,21, 76-81.
50. MAO, X. F., X. S. PIAO, C. H. LAI, D. F. LI, J. J. XING, B. L. SHI (2005): Effects of beta-glucan obtained from the Chinese herb Astragalus membranaceus and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotropic responses of weanling pigs. J. Animal Sci. 83, 2775-2782.
51. MARCUCCI, M. C. (1995): Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 26, 83-99
52. MASSIMA, F., A. C. PAGLIARONE, C. L. ORSATTI, J. P. ARAUJO, J. M. SFORCIN (2010): The effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. Phytotherapy Res. 24, 1501-1507.
53. MELTZER, M. S., R. M. CRAWFORD, M. J. GILBREATH, D. S. FILBLOOM, D. C. DAVIS, A. H. FORTIER, D. SCHREIBERAND, A. C. NACY (1987): Lymphokine regulation of nonspecific macrophage cytotoxicity against neoplastic and microbial targets. Immunopharmacology of infectious disease. (Majed, J. A., Ur.) Alan R. Liss, New York, pp. 27-39.
54. MOHAČEK-GROŠEV, V. (2001): Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. Spectrochim. Acta A 57, 2815-2829.

55. MOON, H. W., T. O. BUNN (1993): Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. Vaccine 11, 213-219.
56. MRŠIĆ, G., D. ŠPOLJARIĆ, H. VALPOTIĆ, M. BALENOVIĆ, L. KOZAČINSKI, I. ŠPOLJARIĆ, I. VALPOTIĆ, V. SAVIĆ, S. SREČEC, M POPOVIĆ (2011): Imunomodulacijski učinak plemenite pečurke Agaricus bisporus u tovnih pilića. Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis. 42, 431-439.
57. MULCAHY, G., P. J. QUINN (1986): A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Therap. 9, 119-139.
58. MURRAY ,H. W. (1984): Macrophage activation. Enhanced oxidative and antiprotozoal activity. U: Adams DO, Hanna MG (ur) Macrophage activation. Plenum press, New York, 97-115.
59. MURTAUGH, M. P. (1994): Porcine cytokines. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 37-44.
60. NABUURS, M. J. (1998): Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. Vet. Q. 20, 42-45.
61. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG (1993): Veterinarska imunologija. Školska knjiga, Zagreb.
62. NAGY, B., P. Z. S. FEKETE (1999): Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. Vet. Res. 30, 259-284.
63. NOVAK, B. (1997): Uzgoj jestivih i ljekovitih gljiva. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
64. ORŠOLIĆ, N., A. HORVAT KNEŽEVIĆ, I. BAŠIĆ (2002): Propolis as a new potential immunomodulator in mice: antimetastatic activity of a water-soluble derivate of propolis (WSDP). Mellifera. 2, 29-46.
65. ORŠOLIĆ, N., V. BENKOVIĆ, D. LISIČIĆ, D. ĐIKIĆ, J. ERHARDT, A. HORVAT KNEŽEVIĆ (2009): Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. Medical oncology. 27, 1346-1358.
66. ORŠOLIĆ, N., D. SIROVINA, I. KOSALEC, I. BAŠIĆ (2010): Honey bee products: immunomodulation and antitumor activity. Comprehensive bioactive natural products / Gupta v.k (ur.). India : Studium press llc, 45-48.
67. ORŠOLIĆ, N. (2012): Bee venom in cancer therapy. Cancer and metastasis reviews. 31, 173-194.

68. O'SHEA, C. J., T. SWEENEY, M. B. LYNCH, D. A. GOHAN, J. J. CALLAN, J. V. O'DOHERTY (2010): Effect of β-glucans contained in barley- and oats-based diets and exogenous enzyme supplementation on gastrointestinal fermentation of finisher pigs and subsequent manure odor and ammonia emission. J. Anim. Sci. 88, 1411-1420.
69. OZTÜRK, M., M.E. DURU, S. KIVRAK, N. MERCAN-DOĞAN, A. TÜRKOGLU, M.A. OZLER (2011): *In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three Agaricus species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. Food Chem. Toxicol.49, 1353-1360.
70. PESCOVITZ, M. D., B. K. BOOK, B. AASTED, J. DOMINGUEZ, A. EZQUERRA, I. TREBICHAVSKY, B. NOVIKOV, I. VALPOTIĆ i sur. (1998): Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the second international swine CD workshop. Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 261-268.
71. PESCOVITZ, M. D., A. G. SAKOPOULOS, J. A. GADDY, R. J. HUSMANN, ZUCKERMANN F. A. (1994): Porcine peripheral blood $CD4^{+/}CD8^{+}$ dual expressing T cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 53-62.
72. PORTER, P., W. D. ALLEN (1972): Classes of immunoglobulins related to the immunity in the pig. J. Am. Vet. Res. 160, 511-518.
73. PRICE, K.L., H.R. TOTTY, H.B. LEE, M.D. UTT, G.E. FRITZNER, I. YOON, M.A. PONDER, J. ESCOBAR (2010): Use of *Saccharomyes cerevisiae* fermentation product on growht performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. J. Anim. Sci. 88**,** 3896-3908.
74. QIUNN, P. J. (1990): Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. U: Blecha F, Charley B (ur) Immunomodulation in domestic food animals. Academic Press, San Diego, California, 43-99.
75. ROTH, J. A. (1999): The Immune System. U: Diseases of Swine, 8. edn. (Straw B. E., D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, Ur.), Blackwell Science, Ltd., 799-820.
76. SFORCIN, J. M: (2007): Propolis and the immune system: a review. J. Ethnopharmacol. 113, 1-14.

77. SFORCIN, J. M., R. O. ORSI, V. BANKOVA (2005): Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. J. Ethnopharmacol. 98, 301-305.
78. SHEN, J., H. REN, C. TOMIYAMA-MIYAJI, Y. SUGA, T. SUGA, Y. KUWANO, T. IIAI, K. HATAKEYAMA, T. ABO (2007): Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts. Biomed. Res. 28, 71-77.
79. STUYVEN, E., E. COX, S. VANCAENEGHEM, S. ARNOUTS, P. DEPREZ, B. M. GODDEERIS (2009): Effect of beta-glucan on an ETEC infection in piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 60-66.
80. ŠPOLJARIĆ, D, T. FUMIĆ, D. KEZIĆ, H. VALPOTIĆ, V. FABIJANIĆ, M. POPOVIĆ, S. SLADOLJEV, G. MRŠIĆ, I. VALPOTIĆ (2011): β-glukani: prirodni modifikatori imunosnog odgovora nedovoljno poznati u veterini. Vet. stanica 42, 361-376.
81. ŠVER, L., N. ORŠOLIĆ, Z. TADIĆ, B. NJARI, I. VALPOTIĆ, I. BAŠIĆ (1996): A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 19, 31-38.
82. ŠVER, L., K. TRUTIN-OSTOVIĆ, D. ŽUBČIĆ, T. A. CASEY, E. A. DEAN, I. VALPOTIĆ (1996): Porcine gut T, B, and null/γδ TCR^+ cell quantification in the protective immunity to fimbrial/toxin antigens of *Escherichia coli*. Period. Biol. 98, 473-477.
83. TIZARD, I. (2002): Veterinary Immunology. 5th ed. WB Saunders Co.
84. TOMAŠKOVIĆ, M. (1997): Diferencijacijski antigeni i tkivna raspodjela imunokompetentnih stanica u svinja. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
85. TUMBLESON, M. E., L. B. SCHOOK (1996): Advances in swine in biomedical research.U: Advances in Swine in Biomedical Research. (Tumbleson, M. E., L. B. Schook Ur.) Plenum Press, New York, SAD, pp 1-4.
86. VEGA-LOPEZ, M. A., E. TELEMO, M. BAILEY, K. STEVENS, C. R. STOKES (1993): Immune cell distribution in the small-intestine of the pig – Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. Vet. Immunol. Immunopathol. 37, 49-60.
87. VOGELLI, P., R. BOLT, R. FRIES, G. STRANZINGER (1994): Cosegregation of malignant hyperthermia and Arg615-Cys615 mutation in the skeletal muscle

calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. Anim. Genet. 1, 59-66.

88. VERDONCK, F., J. J. JOENSUU, E. STUYVEN, J. DE MEYER, M. MUILU, M. PIRHONEN, B. M. GODDEERIS, J. MAST, V. NIKLANDER-TEERI, E. COX (2008): The polymeric stability of the Escherichia coli F4 (K88) fimbriae enhances its mucosal immunogenicity following oral immunization. Vaccine. 45, 5728-5735.
89. VIJTIUK, N., S. ĆURIĆ, G. LACKOVIĆ, I. UDOVIČIĆ, I. VRBANAC, I. VALPOTIĆ (1995): Histopathological features in the small intestine of pigs infected with F4ac$^+$ non-enterotoxigenic or enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. J. Comp. Pathol. 112, 1-10.
90. VIJTIUK, N., L. ŠVER, G. LACKOVIĆ, M. POPOVIĆ, F. BOŽIĆ, I. VALPOTIĆ (2005): Intestinal immune response of weaned pigs experimentally vaccinated with F4ac$^+$ non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Acta. Vet. Brno 74, 595-601.
91. VALPOTIĆ, H. (2009): Utjecaj nutraceutika i imunomodulatora na proizvodnos, imunost i zdravstveno stanje odbijene prasadi. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 73-92.
92. VAN NEVEL, C.J., J. A. DECUYPERE, N. DIERICK, K. MOLLY (2003): The influence of Lentinus edodes (Shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. Arch. Anim. Nutr. 57, 399-412.
93. VETVICKA, V., B. DVORAK, J. VETVICKOVA, J. RICHTER, J. KRIZAN, P. SIMA, J. C. YVIN (2007): Orally administered (1→3)- β-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. Int. J. Biol. Macromol. 40, 291-298.
94. WALLACE, R.J., W. OLESZEK, C. FRANZ, I. HAHN, K.M. BAJER, A. MATHE, K. TEICHMANN (2010): Diatery plant bioactives for poultry health and productivity. Poult. Sci. 51, 461-487.
95. WANI, B.A., R.H. BODHA, A.H. WANI (2010): Nutritional and medicinal importance of mushrooms. J. Med. Plants Res. 4, 2598-2604.
96. WILLIS, W.L., O.S. ISIKHUEMHEN, S.A. IBRAHIM (2007): Performance assessment of broiler chickens given mushroom extract alone or in combination with probiotics. Poult. Sci. 86, 1856-1860.

97. WINDISCH, W.M., K. SCHEDLE, C. PLITZNER, A. KROISMAYR (2008): Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J. Anim. Sci. 86, E140-E148.
98. YANG, W. C., R. D. SCHULTZ (1986): Ontogeny of natural killer cell activity and antibody dependent cell mediated cytotoxicity in pigs. Dev. Comp. Immunol. 10, 405-418.
99. ZEKOVIĆ, Đ.B. (2005): Natural and modified (1→3)-α glucans in healh promotion and disease alleviation. Crit. Rev. Biotechnol. 25, 205-230.
100. ZUCKERMANN, F. A., H. R. GASKINS (1996): Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T-lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. Immunol. 87, 493-499.
101. ZUCKERMANN, F. A., R. J. HUSMANN (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. Immunol. 87, 500-512.
102. ŽARKOVIĆ, N., K. ŽARKOVIĆ, M. KRALJ, S. BOROVIĆ, S. SABOLOVIĆ, M. P. BLAŽI, A. CIPAK, K. PAVELIĆ (2003): Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite. Anticancer Res. 23, 1589-1595.

9. ŽIVOTOPIS

Daniel Špoljarić rođen je 11.02. 1983. u Zagrebu. Maturirao je 2001. godine u srednjoj Tehničkoj školi Ruđera Boškovića (tehničar za elektroniku). Iste godine upisao jeVeterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2008. godine. Od 1.2.2009 zaposlen je na Zavodu za bilogiju u svojstvu znanstvenog novaka-asistenta na projektu MZOŠ-a 053-0532265-2255. Kao suradnik u nastavi sudjeluje na nekoliko kolegija (Molekularna Biologija i genomika u veterini, Botanika u veterinarkoj medicini). Postdiplomski doktorski studij veterinarske znanosti upisao je akademske godine 2009/2010. Član je Hrvatskog imunološkog društva.

Popis radova:

1. Šperanda, Marcela; Valpotić Hrvoje; Šperanda, Tomislav; Đidara, Mislav; Antunović, Zvonko; Mikulec, Željko; Habrun, Boris; Špoljarić, Daniel. Utjecaj prirodnog zeolita klinoptilolita na imunološke pokazatelje u odbite prasadi // 2.Workshop FEEED-TO-FOOD FP7 REGPOT-3 XIV Međunarodni simpozijum TEHNOLOGIJA HRANE ZA ŽIVOTINJE / Lević, Jovanka (ur.). Novi Sad : Institute for Food Technology, 2010. 72-78 (predavanje,međunarodna recenzija,objavljeni rad,znanstveni).
2. Kezić, Dubravko; Kovšca Janjatović, Ana; Špoljarić, Daniel; Valpotić, Hrvoje; Lacković, Gordana; Vijtiuk, Nada; Božić, Frane; Popović, Maja; Valpotić, Ivica. Levamisole increases the number of porcine ileal microfold (M) cells but levamisole-adjuvanted vaccine candidate F4ac+ non-enterotoxigenic Escherichia coli (non-ETEC) strain does not // The 14th International Congress of Immunology 2010. (poster ,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
3. Špoljarić, Daniel; Kovšca-Janjatović, Ana; Lacković, Gordana; Božić, Frane; Fabijanić, Vesna; Popović, Maja; Stokes, R Chris; Valpotić, Ivica. Porcine intestinal M cells: early ontogeny and role in initiation of the intestinal mucosal immune responses // 2010 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society : Book ofAbstracts / Rabatić, Sabina (ur.). Zagreb : Croatian Immunological Society, 2010. 44-44 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
4. Popović, Iva; Špoljarić, Daniel; Šeol, Branka; Popović, Maja; Barić-Rafaj, Renata; Lukač, nutraceutical // Annual Meeting of the Croatian Immunological Society : Book of Abstract. 2008. 37-37 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

5. Valpotić, Hrvoje; Špoljarić, Danijel; Božić, Frane; Šuran Jelena; Fabijanić, Jelena; Šperanda, Marcela; Ivica, Valpotić. Modulation of porcine immunity against enteric bacterial infections by orally applied immune response modifiers or in-feed Kovšca-Janjatović, Ana; Špoljarić, Danijel; Lacković, Gordana; Vijtiuk, Nada; Popović, Maja; Gerenčer, Marijan; Valpotić, Ivica. Quantitative/distribution patterns of the small intestinal CD6+ T cells and NOS in pigs following specific/nonspecific immunization against colidiarrhea/colienterotoxemia // 2008 Annual Meeting of the Croatian Immunological Society : Book of Abstracts. 2008. 36-36 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
6. Popović, Maja; Šperanda, Marcela; Špoljarić, Danijel; Kezić, Dubravko; Sladoljev, Srećko; Valpotić, Ivica. Differential age-dependent profiles of porcine Th1 and Th2 pheripheral blood cells // Book of Abstract. Zagreb, 2007. 36 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
7. Vlahović, Ksenija; Pirkić, Boris; Popović, Iva; Borošak, Hrvoje; Hohšteter, Marko; Kiš, Ivana; Matijatko, Vesna; Muljačić, Ante; Špoljarić Daniel; Popović, Maja. In vitro cultivation of canine limbal transplant. // Acta veterinaria (Beograd). 60 (2010) , 5-6; 437-447 (članak, znanstveni).
8. Kovšca Janjatović, Ana; Lacković, Gordana; Božić, Frane; Špoljarić, Daniel; Popović, Maja; Valpotić, Hrvoje; Vijtiuk, Nada; Pavičić, Željko; Valpotić, Ivica. Histomorphometric characteristics of immune cells in small intestine of pigs perorally immunized with F18ac+ nonenterotoxigenic E. coli vaccinal strain. // European journal of histochemistry. 53 (2009) , 4; 189-198 (članak, znanstveni).
9. Popović, Iva; Tominac, Mirna; Popović, Maja; Muljačić, Ante; Valpotić, Hrvoje; Šperanda, Marcela; Vlahović, Ksenija; Kezić, Dubravko; Špoljarić, Daniel; Valpotić, Ivica. Zuchtung von schweinischer Haut für Transplantation. // Tierärztliche Umschau. 64 (2009) , 1; 29-35 (članak, znanstveni).
10. Mršić, Gordan; Špoljarić, Danijel; Valpotić, Hrvoje; Balenović, Mirta; Kozačinski, Lidija; Špoljarić, Igor; Valpotić, Ivica; Savić, Vladimir; Srečec, Siniša; Popović, Maja. Imunomodulacijski učinak plemenite pečurke Agaricus bisporus u tovnih pilića. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis. 42 (2011) , 5; 431-439 (članak, znanstveni).
11. Pirkić, Boris; Vlahović, Ksenija; Hohštete, Marko; Tominac, Mirna; Muljačić, Ante; Špoljarić, Daniel; Gredelj Šimec, Njetočka; Kreszinger, Mario, Stejskal, Marko;

Popović, Maja. In vitro cultivation of porcine limbal transplant. // Veterinarski arhiv. Supplement. 80 (2010) , 4; 455-466 (članak, znanstveni).

12. Špoljarić, Daniel; Fumić, Tihana; Kezić, Dubravko; Valpotić, Hrvoje; Fabijanić, Vesna; Popović, Maja; Sladoljev, Srećko; Valpotić, Ivica. β-glukani: prirodni modifikatori imunosnog odgovora nedovoljno poznati u veterini. // Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopisa. 42 (2011) , 4; 361-376 (članak, ostalo).
13. Petravić-Tominac, Vlatka; Zechner-Krpan, Vesna; Srečec, Siniša; Šantek, Božidar; Špoljarić, Daniel; Valpotić, Hrvoje; Popović, Maja; Valpotić, Ivica. Iskorišteni pivski kvasac - sirovina za izdvajanje β -glukana primjenjivog u biotehnologiji i biomedicini. // Veterinarska stanica. 40 (2009) ; 65-78 (članak, ostalo).