



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Anja Vujnović

**UTJECAJ KORTIZOLA I PROPOLISA NA
ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI
TUBERKULINA U ZAMORČADI
SENZIBILIZIRANE BAKTERIJOM
*MYCOBACTERIUM BOVIS***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Anja Vujnović

**EFFECTS OF CORTISOL AND
PROPOLIS ON DETERMINING THE
POTENCY OF TUBERCULIN IN GUINEA
PIGS SENSITIZED BY
*MYCOBACTERIUM BOVIS***

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Anja Vujnović

**UTJECAJ KORTIZOLA I PROPOLISA NA
ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI
TUBERKULINA U ZAMORČADI
SENZIBILIZIRANE BAKTERIJOM
*MYCOBACTERIUM BOVIS***

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Branka Šeol Martinec

dr. sc. Svjetlana Terzić

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Anja Vujnović

**EFFECTS OF CORTISOL AND
PROPOLIS ON DETERMINING THE
POTENCY OF TUBERCULIN IN GUINEA
PIGS SENSITIZED BY
*MYCOBACTERIUM BOVIS***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Branka Šeol Martinec, Ph.D., Full Professor

Svjetlana Terzić, Ph.D.

Zagreb, 2024



University of Zagreb

VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Anja Vujnović, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su navedenih u radu.

(potpis sudenta)

Zagreb, 2024.

O MENTORICAMA

Prof. dr. sc. Branka Šeol Martinec

Prof. dr. sc. Branka Šeol Martinec (rođena Šeol) rođena je u Zagrebu 8. rujna 1959. godine. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1978. godine nakon završetka Opće gimnazije u Sisku, a diplomirala je 1984. godine. Po završetku fakulteta zaposlena je kao znanstveni novak na Katedri za biologiju i patologiju uzgojne i lovne divljači Veterinarskog fakulteta gdje je 1986. godine i magistrirala. Od 1986. do 1987. godine radila je kao tehnički suradnik u RO-Jugoinspekt-Zagreb, a 1988. godine zaposlena je na Zavodu za hranidbu domaćih životinja Veterinarskog fakulteta. Iste godine izabrana je u zvanje znanstveni asistent na predmetu Zarazne bolesti domaćih životinja. Doktorirala je 1997. godine nakon čega je 2000., 2004., 2008., 2009. i 2014. godine izabrana u znanstveno-nastavna zvanja docentice, izvanredne profesorice, znanstvene savjetnice, redovite profesorice i redovite profesorice u trajnom zvanju. Tijekom rada na Veterinarskom fakultetu bila je voditeljica nekoliko kolegija na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju te poslijediplomskom studiju, poput kolegija „Veterinarska imunologija“ i „Mikrobiološki laboratorijski rad“, te voditeljica bakteriološkog i mikološkog laboratorija. Također, bila je članica fakultetskih povjerenstava za dodiplomsku i poslijediplomsku nastavu, članica Povjerenstva za izradu Pravilnika o izmjenama Pravilnika o veterinarsko-medicinskim proizvodima Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja te članica i predsjednica fakultetskog Odbora knjižnice.

Sudjelovala je u mnogobrojnim edukacijama i tečajevima te se znanstveno i stručno usavršavala u više navrata na Moredun Research Institute (Edinburgh, Velika Britanija) i Department of Agriculture for Northern Ireland, Veterinary Science Division (Belfast, Sjeverna Irska). Također, bila je suradnica na projektu „Mikoplazmoze i neke uvjetne infektivne bolesti životinja“, a potom i voditeljica znanstvenog projekta pod istim naslovom. Uz to, bila je mentorica na dvanaest diplomskih, četiri magistarska i šest doktorskih radova.

Autorica je ili suautorica niza znanstvenih i stručnih radova te priopćenja na hrvatskim i međunarodnim konferencijama te autorica jedne knjige, nekoliko poglavlja u knjigama te suurednica jedne knjige.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:

- KOMPES, G., B. HABRUN, M. BENIĆ, L. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ, S. DUVNJAK, I. REIL, Ž. CVETNIĆ, B. ŠEOL, A. BAGARIĆ (2023): Antimikrobna osjetljivost i kretanje antimikrobne rezistencije bakterijskih uzročnika infekcija urinarnog trakta u pasa izdvojenih u Hrvatskoj u razdoblju 2012. – 2022. godine. Vet. Stanica. 54, 481-494.
- PINTARIĆ, S., Z. ŠTRITOF, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2022): Resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. Proceedings of the conference Antimicrobial resistance in veterinary medicine : current state and perspectives, 21. - 23. srpnja, Novi Sad, Srbija, str. 128-140.
- ŽARKOVIĆ, I., M. ANDRIŠIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, M. ŠPERANDA, H. VALPOTIĆ, A. JUNGIC, M. BENIĆ, L. CVETNIĆ, S. TERZIĆ (2022): Influence of immunomodulators of viral or bacterial origin and vaccine against Aujeszky's disease on the proportion of peripheral blood B cells in growing pigs. Vet. Stanica. 53, 251-259.
- ŠEOL MARTINEC, BRANKA (2022): Veterinarska mikrobiologija i imunologija. (V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb.
- TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from clinical samples of cats and dogs. 2nd International Conference on "Theme: Recent Advancements in Treatment, Control and Elimination of Infectious Diseases, 5. - 6. ožujka, Washington, SAD, str. 30-30.
- TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Comparison of species-specific multiplex PCR and API 20 Strep for the identification of veterinary clinical *Enterococcus* isolates. Acta Microbiol. Imm. H. 68, 124-124.
- HADŽIĆ, L., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2021): Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 29, 28-36.

Dr. sc. Svjetlana Terzić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

Dr. sc. Svjetlana Terzić rođena je u Osijeku 14. lipnja 1956. godine gdje je završila osnovnu i srednju školu, a Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1975. godine i na istom diplomirala 28. listopada 1980. godine.

Nakon završetka studija, u razdoblju od 1980. do 1993. godine, radila je na svinjogojskim farmama „Belje“ u Dardi i „ABC Pomurka“ u Murskoj Soboti te na peradarskoj farmi „Belje“ u Dardi na poslovima zaštite zdravlja životinja, a zatim u Srednjoj poljoprivrednoj i veterinarskoj školi u Osijeku kao nastavnik stručnih predmeta. Od rujna 1993. godine do umirovljenja 2022. godine bila je zaposlena u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu u Laboratoriju za kontrolu veterinarsko-medicinskih pripravaka u kojem se nastavila baviti stručnim poslovima i znanstvenim radom. Od 2000. godine bila je voditeljica navedenog laboratorija te sudjelovala u brojnim stručnim i znanstvenim aktivnostima Hrvatskog veterinarskog instituta i srodnih ustanova iz područja veterinarstva u Republici Hrvatskoj te nekih europskih tijela nadležnih za veterinarske lijekove.

Dr. sc. Svjetlana Terzić nastavila je znanstveno usavršavanje na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te 8. srpnja 1997. godine obranom magistarskog rada pod naslovom "Imunogenost i stabilnost eksperimentalne vakcine protiv svinjske kuge pripremljene od soja Kina umnoženog u staničnoj kulturi" stekla zvanje magistra znanosti, a 17. srpnja 2000. godine obranom doktorskog rada pod naslovom "Humoralna i stanična imunost prasadi imunizirane atenuiranim sojem Kina i glikoproteinom E2 virusa klasične svinjske kuge" stekla zvanje doktor znanosti u području Biomedicina i zdravstvo, polje Veterinarska medicina. Tijekom radnog vijeka napredovala je do znanstvenog zvanja znanstveni savjetnik u trajnom zvanju te izvanrednog profesora (naslovno zvanje) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također je sudjelovala u izvođenju ekstramuralne nastave Veterinarskog fakulteta te praktične nastave Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Svjetlana Terzić bila je voditeljica jednog znanstvenog projekta i jednog znanstvenog programa financiranih od Ministarstva znanosti te suradnica na tri znanstvena projekta. Objavila je približno 150 stručnih i znanstvenih radova kao autor ili suautor, poglavlje u dva sveučilišna udžbenika, bila recenzent knjige i studijskog programa, a sudjelovala je i na više znanstvenih i stručnih skupova. Dr. sc. Svjetlana Terzić bila je mentor jednog diplomskog rada, jednog magistarskog rada i 5 doktorskih radova te član više povjerenstava za obranu doktorskih radova.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:

- ŠANDOR, K., E. PERAK JUNAKOVIĆ, S. TERZIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, D. FAJDIĆ, M. PEHNEC, S. SINKOVIĆ, I. ČALETA, M. ANDRIŠIĆ (2024): A Green HPLC Approach to Florfenicol Analysis in Pig Urine. *Pharmaceuticals*. 17, 495.
- PERAK JUNAKOVIĆ, E., K. ŠANDOR, S. TERZIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, M. BENIĆ, D. FAJDIĆ, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, I. ŽARKOVIĆ (2023): Influence of Encapsulation of Propolis Extract with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on Polyphenolic Contents during *In Vitro* Simulation of Digestion. *Appl. Sci. (Basel)*. 13, 9357.
- PERAK JUNAKOVIĆ, E., K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, N. ORŠOLIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, D. FAJDIĆ, S. SINKOVIĆ, S. TERZIĆ (2023): Spectrophotometric determination of the main polyphenol groups in propolis samples from different regions of Croatia. *Vet. Arh.* 93, 257-270.
- ŠANDOR, K., E. PERAK JUNAKOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, M. BENIĆ, M. MIHALJEVIĆ, S. TERZIĆ (2023): Analysis of florfenicol in pig plasma using a validated PPT-HPLC-DAD method. *Vet. Stanica*. 54, 265-277.
- ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. BENDELJA, A. SAVIĆ MLAKAR, N. ORŠOLIĆ, L. ŠVER, M. BENIĆ, S. TERZIĆ (2022): Effects of immunostimulators of microbial origin on T cells of pigs vaccinated with attenuated vaccine against Aujeszky's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 243, 110365.
- ŽARKOVIĆ, I., M. ANDRIŠIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, M. ŠPERANDA, H. VALPOTIĆ, A. JUNGIC, M. BENIĆ, L. CVETNIĆ, S. TERZIĆ (2022): Influence of immunomodulators of viral or bacterial origin and vaccine against Aujeszky's disease on the proportion of peripheral blood B cells in growing pigs. *Vet. Stanica*. 53, 251-259.
- VRETENAR ŠPIGELSKI, K., E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, S. SINKOVIĆ, I. ŽARKOVIĆ, D. FAJDIĆ, S. TERZIĆ (2021): Mineralna ulja u ulozi adjuvansa u veterinarskim cjepivima. *Vet. Stanica*. 52, 579-586.

TERZIĆ, S., M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, D. FAJDIĆ, K. ŠANDOR (2020): Mogućnost primjene neodobrenih veterinarsko-medicinskih proizvoda (off - label use). Vet. Stanica. 51, 455-461.

ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, H. VALPOTIĆ, K. BENDELJA, Ž. CVETNIĆ, F. BOŽIĆ, S. TERZIĆ (2020): Phenotype analysis of CD3+CD16+ lymphocytes in the peripheral blood of pigs. Vet. Stanica. 51, 117-128.

ŠANDOR, K., M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, S. TERZIĆ (2020): Development of an SPE-HPLC-DAD method for the experimental study of florfenicol and florfenicol amine in pig cerebrospinal fluid. Vet. Stanica. 51, 129-138.

TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, D. FAJDIĆ (2020): Konvencija Vijeća Europe o krivotvorenju farmaceutskih proizvoda i sličnim kažnjivim djelima koja uključuju prijetnje javnom zdravlju. Vet. Stanica. 51, 1-4.

Zahvaljujem se mentoricama prof. dr. sc. Branki Šeol Martinec i dr. sc. Svjetlani Terzić na stručnom vodstvu, uloženom vremenu i trudu, osiguravanju uvjeta za neometano provođenje praktičnog dijela rada, pruženoj pomoći i savjetima, a posebice na velikom strpljenju tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Veliko hvala Hrvatskom veterinarskom institutu, posebice akademiku Željku Cvetniću i izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu na pruženoj prilici i ukazanoj sveobuhvatnoj potpori.

Beskrajno sam zahvalna Angeli Bradarić, tehničkoj suradnici Laboratorija za patologiju, na uloženom vremenu i trudu te nesebičnoj pomoći u provođenju patohistoloških i imunohistokemijskih pretraga uzoraka kože, kao i dr. sc. Željku Mihaljeviću i Šimunu Naletiliću, univ. mag. dr. med. vet., voditelju i zamjeniku voditelja Laboratorija za patologiju, za pomoć u izradi fotografija i analizi rezultata navedenih pretraga kao i za pomoć pri statističkoj obradi rezultata ostalih pretraga. Zahvaljujem se i tehničkim suradnicama Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, Anđeli Krčelić i Silviji Drašković, za pomoć u pripremi kulture bakterije Mycobacterium bovis i izvođenju imunoenzimnih analiza uzoraka sline i krvi, kao i dr. sc. Darku Kolariću s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu za pomoć pri termografskom snimanju.

Veliko hvala i svim sadašnjim i bivšim kolegama iz Laboratorija za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka, posebice dr. sc. Ireni Žarković, dr. sc. Kseniji Šandor, dr. sc. Miroslavu Andrišiću, dr. sc. Eleonori Perak Junaković, Dominiki Fajdić, dr. med. vet., Sonji Sinković, dr. med. vet., Katji Vretenar Špigelski, dr. med. vet., Mirti Pehnec, dr. med. vet. i Ana-Mariji Bolarić, koji su pomogli u organizaciji i izvođenju praktičnog dijela ovog rada te svojom kolegijalnošću i prijateljskim savjetima znatno doprinijeli izradi ovog doktorskog rada.

Također, zahvaljujem se članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu doktorskog rada na uloženom vremenu te stručnim i konstruktivnim prijedlozima i savjetima.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojim najbližima, obitelji i prijateljima, bez čije ljubavi, bezuvjetne podrške i neizmjerne vjere u moj uspjeh ovaj rad ne bi bio ostvaren. Hvala vam na nepresušnom strpljenju, konstantnom ohrabrenju i nerijetkom preuzimanju svih mogućih malih i velikih svakodnevnih obveza kako bi se meni omogućilo slobodno i neometano vrijeme za rad. Mama, ovo je za tebe.

SAŽETAK

UTJECAJ KORTIZOLA I PROPOLISA NA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI TUBERKULINA U ZAMORČADI SENZIBILIZIRANE BAKTERIJOM *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Kontrola biološke aktivnosti tuberkulinskih pročišćenih proteinskih derivata provodi se biološkim pokusom, a temelji se na izazivanju reakcije kasne preosjetljivosti na koži senzibilizirane zamorčadi. Povišenje razina kortizola koje prethodi senzibilizaciji nekim antigenom ili ponovnom kontaktu s tim antigenom može pojačati imunosni odgovor, tj. reakciju kasne preosjetljivosti. Međutim, propolis može umanjiti učinke kortizola na imunosni sustav.

Istraživanje je provedeno na 30 zamorčica podijeljenih u kontrolnu (K) i tri pokusne skupine (P1 – P3). Pokusne skupine su na dan 0 pokusa senzibilizirane bakterijom *Mycobacterium bovis*. Skupini P3 je svakodnevno tijekom pokusa primjenjivan vodeni ekstrakt propolisa. Na 42. dan pokusa, skupinama P2 i P3 je primijenjen kortizol, a tri sata nakon toga su svim skupinama u kožu leđa primijenjene otopine međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata. Dvadeset i četiri sata poslije, očitane su i termografskom kamerom snimljene reakcije nastale na mjestima primjene te izuzeti uzorci kože u kojima je patohistološkim i imunohistokemijskim analizama utvrđena razina infiltracije i sastav staničnog infiltrata te proizvodnja citokina. Nakon pokusa izvršene su hematološke i biokemijske analize uzoraka krvi te određene razine kortizola u uzorcima sline i krvi.

Vrijednosti većine istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja bile su unutar fizioloških raspona u sve četiri skupine, iako je broj leukocita u skupini P2 bio značajno veći u odnosu na broj leukocita u skupinama K i P1 dok su broj neutrofila i vrijednost MCH u skupini P2 bili značajno veći nego u preostale tri skupine. Razine urea nitrata zabilježene u skupinama P2 i P3 bile su značajno manje od onih zabilježenih u skupinama K i P1. Niti kortizol niti propolis nisu značajno utjecali na promjere reakcija nastalih na mjestima primjene međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata, iako je kortizol pojačao, a propolis smanjio intenzitet reakcije kasne preosjetljivosti. Termografija se nije pokazala pouzdanom metodom očitavanja reakcija na primjenu međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata u senzibilizirane zamorčadi.

Ključne riječi: tuberkulinski kožni test, tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat, biološka aktivnost, kasna preosjetljivost, kortizol, glukokortikoidi, propolis

EXTENDED ABSTRACT

EFFECTS OF CORTISOL AND PROPOLIS ON DETERMINING THE POTENCY OF TUBERCULIN IN GUINEA PIGS SENSITIZED BY *MYCOBACTERIUM BOVIS*

INTRODUCTION

Tuberculosis is a chronic disease of man and many domestic and wild animal species caused by mycobacteria belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex. Although known to mankind since the ancient times tuberculosis is still a major public health concern which has a huge impact on global economy. Due to its zoonotic potential surveillance and eradication programs of this disease in domestic animals are being conducted worldwide. Main focus of these programs is eradication of tuberculosis in cattle as they are the major reservoir of *Mycobacterium bovis* which is the main causative agent of zoonotic tuberculosis in humans. These programs are based on the early identification of infected animals usually by performing tuberculin skin test during which tuberculin purified protein derivative is used as a diagnostic tool. Quality of this diagnostic tool is essential for success of eradication programs. Tuberculin purified protein derivatives are preparations obtained from the heat-treated products of growth and lysis of mycobacteria capable of revealing a delayed hypersensitivity in an animal sensitised to microorganisms of the same species. Hypersensitivity reactions are inappropriate and exaggerated immune responses triggered by the interaction of immune system with an antigen to which organism was sensitized during initial exposure or previous contact. These exaggerated reactions cause tissue damage. Based on the type of antigens that cause them, type of immune reaction which mediates them and pathophysiological mechanisms leading to tissue damage hypersensitivity reactions can be divided in four types. Unlike first three types, which are all mediated by antibodies and occur within 24 hours after exposure to antigens which cause them, delayed hypersensitivity (type IV) is mediated by antigen specific T lymphocytes and occurs 24 - 72 hours after exposure to antigen causing it. Delayed hypersensitivity is usually caused by various intracellular pathogens, including mycobacteria, fungi and certain viruses and parasites but it also occurs after exposure to some chemicals and organ transplantation or it can be tumor induced. It can be further divided into four subtypes based on the type of T lymphocytes that mediates it and cytokines produced by those T lymphocytes. Delayed hypersensitivity caused by mycobacterial antigens is classified as subtype „a“ of delayed hypersensitivity (type IVa hypersensitivity reaction) which is mediated by T helper lymphocytes whose main effector cytokine is interferon gamma. As interferon gamma activates

macrophages one of the main characteristics of this subtype of delayed hypersensitivity is accumulation and activation of macrophages at the reaction site. Increased synthesis and release of cytokines, such as tumor necrosis alpha, interleukin-1 and interleukin-6, and reactive oxygen metabolites by activated macrophages and other inflammatory cells at the reaction site cause vasodilatation, increased vascular permeability, fibrin deposition and tissue damage which clinically manifest in form of induration and erythema. The most important quality indicator of tuberculin purified protein derivatives is their potency which is the measure of their capability to induce a delayed hypersensitivity in a sensitized organism. The only currently approved potency control test is bioassay which is routinely performed on guinea pigs according to the method described in the European Pharmacopoeia. During this bioassay tuberculin purified protein derivative is used to induce a delayed hypersensitivity in guinea pigs sensitized by mycobacteria used to prepare it. Potency of tuberculin purified protein derivatives is calculated based on the size of diameters of reactions, i.e induration and erythema, which appear on the skin of guinea pigs at injection sites.

As guinea pigs are prey animals they are very susceptible to fear and stress. Stress is a state during which homeostasis is actually threatened or perceived to be threatened. It can be triggered by number of physical, psychic or social factors. Organism responds to stress by activating sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis which leads to increased synthesis and release of catecholamines and glucocorticoids. Although primary function of glucocorticoids is regulation of carbohydrate, protein and fat metabolism they also play significant roles in many physiological processes, including immune responses, bone formation, reproduction, etc. In humans and guinea pigs cortisol is the predominant circulating glucocorticoid. Chronic stress or long term exposure to glucocorticoids cause immunosuppression and increase susceptibility to infections. However, there is mounting evidence that in certain cases acute stress or short-term increase of glucocorticoid levels can intensify immune response to infection or injury. Recent studies show that short-term increase of glucocorticoid levels or acute stress experienced shortly before sensitization or secondary contact with the antigen that caused it enhance primary and secondary immune responses and thus increase intensity of delayed hypersensitivity which results in more expressed clinical signs.

Nowdays, research concerning use of certain natural substances in livestock nutrition with the purpose of increasing general resistance of animals to stress and various infections is intensifying. One of these substances is propolis, which has proven immunomodulatory properties, and according to new research can to a certain extent modulate release of

glucocorticoids during stress or decrease their effects on immune system. Raw propolis is composed of approximately 50 % plant resins and balsams, 30 % waxes, 10 % essential and aromatic oils, 5 % pollens and 5 % other organic substances and minerals. Although more than 600 constituents have been identified in propolis, most biological effects of propolis are attributed to polyphenols which are considered propolis' active substances. Studies show that polyphenols can either stimulate or inhibit immune reactions by interfering with molecular mechanisms responsible for activation of immune cells, in a dose dependent way. Studies conducted on various experimental animal models of acute and chronic inflammation as well as delayed hypersensitivity reaction showed that propolis and certain polyphenols it contains exert anti-inflammatory effects which in some cases are similar to those of anti-inflammatory drugs. However, chemical composition of propolis and ratio of polyphenols it contains varies significantly depending on geographical zone where it is gathered and type of flora in that region. Raw propolis must be extracted before use in order to eliminate inert materials while preserving the bioactive fractions. Selection of extracting solvent is a crucial step as different solvents extract different bioactive substances. Although water extracts of propolis are biologically most compatible and their use is safe, they contain much lower concentration of bioactive substances due to their limited solubility in water. However, biological activity of propolis doesn't depend only on its composition and extraction method but also on other factors such as dose, duration of administration and synergy with other substances.

Based on all of the above we hypothesise that cortisol applied to guinea pigs sensitized to mycobacteria shortly before induction of delayed hypersensitivity by injections of tuberculin purified protein derivative can intensify immune response and thus cause the enlargement of cutaneous skin reactions. We also hypothesise that propolis due to its immunomodulatory properties can reduce the effects of cortisol on intensity of immune response to mycobacterial antigens at tuberculin purified protein derivative injection site and thus prevent enlargement of cutaneous skin reactions caused by cortisol.

Main goal of this research is to determine to which extent can single injection of cortisol, the primary stress hormone, applied shortly before bovine purified protein derivative affect clinical manifestation of delayed hypersensitivity, i.e. diameters of cutaneous reactions, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium bovis*. Additionally, the aim is to investigate immunomodulatory effects of water extract of propolis originating from continental Croatia on delayed hypersensitivity induced by bovine purified protein derivative in guinea pigs sensitized by *Mycobacterium bovis* after short-term exposure to cortisol. Magnitude and composition of cellular infiltration and production of cytokines at sites of delayed hypersensitivity induced by

tuberculin purified protein derivative will be determined by patohistological and immunohistochemical analyses of skin samples. Intensity of delayed hypersensitivity induced by different concentrations of tuberculin purified protein derivative will be analysed by thermography, i.e. by comparing temperatures of skin at injection sites.

Knowledge gained from this research will be applicable in various scientific fields. Results of this reasearch will provide an insight into biological mechanisms through which cortisol can enhance or supress development of cell-mediated immune responses. This will result in better understanding of complex interactions between immune and endocrine system. This study findings will also expand current knowledge about potential uses of propolis originating from continental Croatia and help in the evaluation of thermography as an auxiliary method for cutaneous reactions reading during tuberculin purified protein derivative potency bioassays.

MATERIAL AND METHODS

For the purpose of this research a study using thirty guinea pigs divided in four groups (control group (K) containing six animals and three experimental groups (P1 – P3) containing eight animals each) was conducted. On the day 0 of the experiment all of the guinea pigs from experimental groups were sensitized with inactivated *Mycobacterium bovis*. Water extract of propolis originating from continental Croatia was applied to guinea pigs from group P3 once a day throughout the whole experiment. On the 42nd day of the experiment injection of cortisol was applied to guinea pigs from P2 and P3 groups. Three hours later three serial dilutions of international bovine tuberculin purified protein derivative were injected in the skin of the back of all of the guinea pigs in the experiment. Twenty four hours later, diameters of cutaneous lesions on the injection sites were measured and recorded by thermal imaging camera. Blood samples were subjected to hematological and biochemical analysis and used to determine cortisol blood levels. Cortisol levels were also determined in collected saliva samples. Cellular composition and production of cytokines on the international bovine purified protein derivative injection sites were determined by histopathologic and immunohistochemical analysis of skin samples.

RESULTS

Administration of propolis did not significantly affect body weight of guinea pigs from P3 group. Values of most investigated hematological and biochemical blood parameters were within reference values in all four groups, however leukocyte count in group P2 was

significantly higher than leukocyte counts in groups K and P1 whereas neutrophil count and MCV value measured in group P2 were significantly higher than those measured in all of the other groups. Urea nitrogen levels measured in groups P2 and P3 were significantly lower than those measured in groups K and P1. Salivary cortisol levels were equal and steady in all four groups up until second sampling on the 43rd day of the experiment when due to cortisol injection they rose significantly in P2 and P3 groups. Salivary cortisol levels in those two groups remained significantly higher than those measured in K and P1 groups throughout day 43 but returned to baseline levels on the 44th day of the experiment. There were no significant differences between groups in cortisol levels measured in blood samples obtained after euthanasia. No reactions were observed on the international bovine tuberculin purified protein derivative injection sites in unsensitized guinea pigs from group K. No significant differences were found between diameters of cutaneous reactions observed on the international bovine tuberculin purified protein derivative injection sites between sensitized guinea pigs from experimental groups, although biggest diameters were measured in P2 group, and smallest in P3 group. Also, cellular infiltrate observed on the injection sites which comprised mostly of mononuclear cells was more abundant in group P2 than in groups P1 and P3. Proinflammatory cytokine production at delayed hypersensitivity sites was most pronounced in group P2 and least pronounced in group P3. No differences between untreated skin temperatures and temperatures of the skin at the international bovine tuberculin purified protein derivative injection sites were detected by thermal camera in any of the groups.

CONCLUSIONS

Water extract of propolis originating from continental Croatia administered daily for 44 days has no significant effect on body weight of guinea pigs. One injection of cortisol significantly increases leukocyte count, neutrophil count and MCH value and significantly reduces urea nitrogen levels but has no effect on other hematological and biochemical parameters in sensitized guinea pigs given injections of international bovine tuberculin purified protein derivative. Water extract of propolis used in this experiment reduces neutrophil count caused by one-time exposure to cortisol but has no other significant effects on hematological and biochemical blood parameters in sensitized guinea pigs which received one injection of cortisol followed by injections of international bovine tuberculin purified protein derivative. Cortisol applied 3 hours before tuberculin purified protein derivative injections doesn't have significant effect on diameters of cutaneous reactions in sensitized guinea pigs, however it increases intensity of delayed hypersensitivity by increasing cellular accumulation and

production of proinflammatory cytokines at the tuberculin purified protein derivative injection sites. Water extract of propolis originating from continental Croatia administered daily for 44 days has no significant effect on diameters of cutaneous reactions in sensitized guinea pigs given one injection of cortisol 3 hours before tuberculin purified protein derivative injections, however it decreases intensity of delayed hypersensitivity by decreasing production of proinflammatory cytokines at reaction site. Thermography is not a reliable method of cutaneous reactions reading during tuberculin purified protein derivative potency bioassays conducted in guinea pigs. Salivary cortisol measurement is a reliable method of monitoring exposure of guinea pigs to stress during this type of experiments.

KEY WORDS: tuberculin skin test, tuberculin purified protein derivative, biological activity, delayed type hypersensitivity, cortisol, glucocorticoids, propolis

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. Tuberkuloza	5
2.1.1. Značaj i rasprostranjenost	5
2.1.2. Uzročnici tuberkuloze i primljive vrste	6
2.1.3. Putevi prijenosa infekcije vrstom <i>M. bovis</i>	8
2.1.4. Imunopatogeneza tuberkuloze	9
2.1.5. Dijagnostika tuberkuloze u goveda i programi iskorjenjivanja	12
2.2. Kortizol.....	25
2.2.1. Imunoregulacija posredovana glukokortikoidima	27
2.3. Propolis.....	31
2.3.1. Imunomodulacijsko djelovanje propolisa	33
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	38
4. MATERIJAL I METODE	42
4.1. Materijal.....	43
4.1.1. Životinje u pokusu	43
4.1.2. Inaktivirana kultura bakterije <i>Mycobacterium bovis</i> za senzibilizaciju zamorčića	43
4.1.3. Propolis	45
4.1.4. Kortizol	45
4.1.5. Otopine međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata	45
4.1.6. Anestetici i analgetici.....	46
4.1.7. Termografski sustav za primjenu u medicini (ThermoMED IRB-ZEL)	47
4.2. Plan istraživanja.....	48
4.2.1. Pokus.....	48
4.2.2. Uzorci.....	51
4.3. Metode	52
4.3.1. Termografsko snimanje	52
4.3.2. Očitavanje reakcija na primjenu međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata.....	52
4.3.3. Određivanje razina kortizola u uzorcima sline	53
4.3.4. Određivanje razina kortizola u uzorcima krvi	54
4.3.5. Hematološka pretraga	56
4.3.6. Određivanje serumskih biokemijskih pokazatelja	57

4.3.7. Patohistološka pretraga	57
4.3.8. Imunohistokemijska pretraga.....	58
4.4. Statistička obrada rezultata	60
5. REZULTATI.....	61
5.1. Zdravstveni nadzor životinja u pokusu.....	62
5.2. Promjene tjelesne mase životinja tijekom pokusa	63
5.3. Rezultati očitavanja reakcija na primjenu međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata	65
5.4. Termografsko snimanje	66
5.5. Razine kortizola određene u uzorcima sline.....	67
5.6. Razine kortizola određene u uzorcima krvi	68
5.7. Rezultati hematološke pretrage	69
5.7.1. Eritrocitni hematološki pokazatelji	69
5.7.2. Leukocitni hematološki pokazatelji	70
5.7.3. Trombocitni hematološki pokazatelji	72
5.8. Serumski biokemijski pokazatelji.....	73
5.9. Rezultati patohistološke analize	75
5.10. Rezultati imunohistokemijske analize	76
6. RASPRAVA.....	83
7. ZAKLJUČCI.....	99
8. POPIS LITERATURE	101
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	130

POPIS KRATICA

ACTH	adrenokortikotropni hormon (engl. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ALP	alkalna fosfataza (engl. <i>alkaline phosphatase</i>)
ALT	alanin aminotransferaza (engl. <i>alanine aminotransferase</i>)
AP-1	aktivator proteina 1 (engl. <i>activator protein</i>)
APC	stanice koje prikazuju antigen (engl. <i>antigen presenting cells</i>)
aPPD	avijarni tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat
AVP	arginin vazopresin (engl. <i>arginine vasopressin</i>)
bPPD	bovini tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat
CAPE	fenetil ester kafeinske kiseline (engl. <i>caffeic acid phenethyl ester</i>)
CD	stanični biljezi (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
CRH	hormon koji oslobađa kortikotropin (engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EEZ	Europska ekonomska zajednica
EK	Europska Komisija
EU	Europska unija
GK	glukokortikoidi
GR	glukokortikoidni receptor
hPPD	humani tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat
HVI	Hrvatski veterinarski institut
i.j.	internacionalna jedinica
IFN- γ	interferon gama (engl. <i>interferon-gamma</i>)
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MCH	prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)
MCV	prosječni volumen eritrocita (engl. <i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MIP-2	upalni protein makrofaga-2 (engl. <i>macrophage inflammatory protein-2</i>)
MPV	prosječni volumen trombocita (engl. <i>Mean Platelet Volume</i>)

MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks (engl. <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>)
NF-kB	nuklearni faktor kappa B (engl. <i>Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B cells</i>)
NK	stanice prirodni ubojice (engl. <i>Natural Killer cells</i>)
NN	Narodne Novine
NTM	netuberkulozne mikobakterije
osovina HHN	osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
PDWC	koeficijent varijacije raspodjele trombocita po volumenu (engl. <i>Platelet Distribution Width Coefficient of Variation</i>)
PDWS	koeficijent varijacije raspodjele trombocita po volumenu (engl. <i>Platelet Distribution Width Standard Deviation</i>)
Ph. Eur.	Europska farmakopeja (engl. <i>European Pharmacopeia</i>)
RDWC	koeficijent varijacije raspodjele eritrocita po volumenu (engl. <i>Red Cell Distribution Width Coefficient of Variation</i>)
RDWS	standardna devijacija raspodjele eritrocita po volumenu (engl. <i>Red Cell Distribution Width Standard Deviation</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
Th	pomoćnički T-limfociti (engl. <i>T helper cells</i>)
TKT	tuberkulinski kožni test
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizirajući faktor α (engl. <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
tuberkulinski PPD	tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
WOAH	Svjetska organizacija za zdravlje životinja (engl. <i>World Organisation for Animal Health</i>)

1. UVOD

Tuberkuloza je kronična zarazna bolest ljudi te mnogih vrsta domaćih i divljih životinja koju u sisavaca uzrokuju mikobakterije iz *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa. Unatoč tome što se radi o bolesti poznatoj od samih početaka civilizacije, tuberkuloza je i danas jedan od vodećih javnozdravstvenih prioriteta koji ima značajan utjecaj na globalnu ekonomiju. S obzirom na to da se radi o bolesti velikog zoonotskog potencijala veliki naponi se ulažu u iskorjenjivanje ove bolesti u domaćih životinja, a posebice u goveda koja su najznačajniji rezervoar vrste *Mycobacterium bovis*, najčešćeg uzročnika zoonotske tuberkuloze u ljudi. Programi iskorjenjivanja temelje se na ranom otkrivanju goveda inficiranih tuberkuloznim mikobakterijama, najčešće provođenjem tuberkulinskog kožnog testa (TKT), pri čemu vrlo važnu ulogu ima dijagnostički pripravak tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat (tuberkulinski PPD). Nakon testiranja, pozitivne životinje se izlučuju iz stada i šalju na klanje. Tuberkulinski PPD-i su dijagnostički pripravci dobiveni termičkom obradom produkata rasta i lize mikobakterija koji u ljudi ili životinja senzibiliziranih mikroorganizmima iste vrste mogu izazvati reakciju kasne preosjetljivosti. Biološka aktivnost tuberkulinskih PPD-a mjeri se njihove sposobnosti da u senzibiliziranom organizmu izazovu reakciju kasne preosjetljivosti te najvažniji pokazatelj njihove kvalitete. Biološka aktivnost tuberkulinskih PPD-a kontrolira se biološkim pokusom na zamorčadi, tj. izazivanjem reakcije kasne preosjetljivosti u zamorčadi senzibilizirane vrstom mikobakterije korištene za pripravu ispitivanog tuberkulinskog PPD-a. Reakcije (oteklina i crvenilo) koje se javljaju na koži zamorčića na mjestima primjene ispitivanog PPD-a, a na temelju čijih promjera se određuje aktivnost ispitivanog tuberkulinskog bPPD-a, predstavljaju neprimjereno jak lokalni stanično posredovani sekundarni (memorijski) imunosni odgovor na ponovni kontakt s antigenom na koji je organizam tijekom prethodnog kontakta senzibiliziran.

Laboratorijske životinje su za vrijeme provođenja bioloških pokusa neizbježno u određenoj mjeri izložene stresu. Poznato je kako dugotrajna izloženost stresu ili povećanoj razini glukokortikoida (GK) dovodi do imunosupresije i povećava podložnost organizma infekcijama. Međutim, sve je više dokaza kako akutni stres ili kratkotrajno povišenje razina GK u određenim uvjetima mogu pojačati imunosni odgovor organizma na ozljedu ili infekciju. Istraživanja pokazuju kako izlaganje akutnom stresu ili kratkotrajno povišenje razine GK koje prethodi senzibilizaciji organizma nekim antigenom pojačava sekundarni imunosni odgovor i rezultira dugotrajnijom imunitetom na taj antigen. Pokazalo se i kako izlaganje akutnom stresu ili kratkotrajno povišenje razine GK koje prethodi ponovnom kontaktu organizma s antigenom koji je izazvao senzibilizaciju također pojačava sekundarni imunosni odgovor na taj antigen.

U današnje vrijeme sve se više istražuje primjena određenih prirodnih tvari u prehrani domaćih životinja čija bi svrha trebala biti pojačavanje opće otpornosti organizma u uvjetima stresa te izloženosti raznim infekcijama. Jedna od takvih tvari je propolis, tvar dokazanog imunomodulacijskog djelovanja, koja prema novijim istraživanjima može, do određene mjere, regulirati izlučivanje GK tijekom izloženosti stresu ili umanjiti učinke GK na imunosni sustav. Istraživanja pokazuju da polifenoli koje propolis sadržava, a koji se smatraju odgovornima za njegova biološka djelovanja, djelovanjem na molekularne mehanizme uključene u proces aktivacije stanica imunosnog sustava mogu stimulirati ili suprimirati razvoj i tijek imunosnih reakcija, ovisno o primijenjenoj dozi. Također, istraživanja provedena u laboratorijskih životinja na raznim modelima akutnih i kroničnih upala, kao i na modelu reakcije kasne preosjetljivosti, dokazuju protuupalno djelovanje propolisa i pojedinih polifenola koje sadržava, a koje se u pojedinim slučajevima može usporediti s učinkom protuupalnih lijekova. Međutim, biološko djelovanje propolisa, osim o primijenjenoj dozi, znatno ovisi i o njegovom botaničkom podrijetlu, sastavu i načinu ekstrakcije, trajanju primjene te sinergiji s drugim tvarima.

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi u kojoj mjeri hormon stresa, kortizol, primijenjen jednokratno prije primjene bPPD-a može utjecati na promjere reakcija koje se javljaju na koži zamorčića senzibiliziranih bakterijom *Mycobacterium bovis* na mjestima primjene bPPD-a. Dodatno, cilj je istražiti imunomodulacijsko djelovanje vodenog ekstrakta propolisa s područja kontinentalne Hrvatske na modelu reakcije kasne preosjetljivosti izazvane bPPD-om u senzibiliziranih zamorčića prethodno izloženih djelovanju kortizola.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Tuberkuloza

2.1.1. Značaj i rasprostranjenost

Tuberkuloza je diljem svijeta rasprostranjena kronična zarazna bolest od koje obolijevaju ljudi i mnoge vrste domaćih i divljih životinja. Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) uzročnika tuberkuloze izdvojena je iz više od 17000 godina starih koštanih uzoraka izumrle vrste bizona pronađenih u Wyomingu u Sjedinjenim Američkim Državama te iz približno 9000 godina starih kostiju majke i djeteta pronađenih na obali Sredozemnog mora u Izraelu (ROTHSCHILD i sur., 2001, HERSHKOVITZ i sur., 2008.). Također, promjene karakteristične za tuberkulozu pronađene su na kostima egipatskih i peruanskih mumija te na kostima s arheoloških nalazišta iz doba neolitika na području Europe i Bliskog istoka (DANIEL, 2006., GOOD i sur., 2018.; BUZIC i GIUFFRA, 2020.). Ovi nalazi svjedoče da je tuberkuloza jedna od najstarijih poznatih bolesti. Unatoč tome, sve do 19. stoljeća tuberkuloza nije bila prepoznata kao jedinstvena bolest već su se za opis kliničkih oblika bolesti tijekom povijesti koristili različiti izrazi poput ftiza, sušica, Pottova bolest, skrofula, bijela kuga, itd. Današnji je naziv tuberkuloza dobila prema karakterističnim čvorićima u tkivima inficiranih organizama, a koje je škotski patolog Matthew Baille 1793. godine nazvao tuberkuli (DANIEL, 2006.; BARBERIS i sur., 2017.).

Briga o zdravlju ljudi i zaštita od širenja tuberkuloze povezana je i s mjerama zaštite zdravlja životinja. Iako i ostale vrste domaćih i divljih životinja obolijevaju od tuberkuloze, najveći javnozdravstveni, gospodarski i ekonomski značaj u veterinarskoj medicini i uzgoju domaćih životinja ima tuberkuloza u goveda. Zbog smanjene proizvodnje mlijeka i mesa, prijevremenog izlučivanja i povećane smrtnosti goveda te visokih troškova programa nadziranja i iskorjenjivanja, tuberkuloza goveda nanosi ogromne ekonomske gubitke globalnoj stočarskoj proizvodnji (PARLANE i BUDDLE, 2015.). STEELE (1995.) procjenjuje kako godišnji financijski gubitci uzrokovani tuberkulozom goveda iznose 3 bilijuna američkih dolara. Osim toga, goveda su najznačajni rezervoar vrste *Mycobacterium (M.) bovis*, jednog od uzročnika tuberkuloze, te glavni izvor infekcije ljudi tim uzročnikom (ANONIMNO, 2023a.). Vrsta *M. bovis* najčešći je uzročnik zoonotske tuberkuloze u ljudi (MÜLLER i sur., 2013.). Procjenjuje se da je početkom 20. stoljeća približno 30 % ljudi oboljelih od tuberkuloze imalo zoonotski oblik bolesti uzrokovan bakterijom *M. bovis* (WATERS i sur., 2010.). Tuberkuloza je danas u ljudi drugi najčešći uzrok smrti zbog zaraznih bolesti i jedan od petnaest glavnih uzroka smrti u svijetu (ANONIMNO, 2023b.; ANONIMNO, 2023d.). S obzirom na to da se

radi o bolesti velikog zoonotskog potencijala, borba protiv tuberkuloze zahtijeva multidisciplinarnu suradnju na lokalnoj, nacionalnoj i globalnoj razini. Poboljšanje higijene namirnica životinjskog podrijetla i uvođenje programa nadzora i iskorjenjivanja tuberkuloze u goveda u razvijenim zemljama doveli su do znatnog smanjenja broja ljudi oboljelih zbog doticaja s tuberkuloznim životinjama i proizvodima podrijetlom od takvih životinja. Svake godine od tuberkuloze oboli približno 10 milijuna ljudi, a Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) je 2016. godine procijenila kako se u 1,4 % slučajeva zabilježenih te godine radilo o zoonotskom obliku bolesti. Međutim, s obzirom na to da se zoonotska tuberkuloza najčešće javlja u azijskim i afričkim zemljama u razvoju, gdje za razliku od razvijenih zemalja nedostaje dijagnostičke opreme i laboratorija te ne postoji obveza prijavljivanja ove bolesti nadležnim tijelima kao niti kvalitetni programi nadziranja i iskorjenjivanja bolesti u stoke, smatra se da ova procjena nije pouzdana te da je stvarni broj oboljelih od zoonotske tuberkuloze znatno veći (MÜLLER i sur., 2013.; TEPPAWAR i sur., 2018.; LUCIANO i ROESS, 2020.). U nerazvijenim zemljama širenju zoonotske tuberkuloze pogoduju socio-ekonomske prilike i tradicionalan način života (TEPPAWAR i sur., 2018.), međutim ona se još uvijek javlja i u razvijenim zemljama u kojima unatoč kontinuiranom provođenju programa iskorjenjivanja problem predstavljaju populacije divljih životinja u kojima je bolest još uvijek prisutna, a koje predstavljaju trajni izvor infekcije za domaće životinje te posljedično i čovjeka (PALMER, 2007.; ANONIMNO, 2023a.). U Republici Hrvatskoj su prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo zabilježena tri slučaja tuberkuloze ljudi uzrokovane vrstom *M. bovis*, prvi 2005. godine, drugi 2012. godine, a treći 2019. godine (ANONIMNO, 2020.; ANONIMNO, 2021.).

2.1.2. Uzročnici tuberkuloze i primljive vrste

Tuberkulozu u sisavaca uzrokuju bakterije svrstane u posebnu skupinu, nazvanu *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, unutar roda *Mycobacterium*. Rod *Mycobacterium*, jedini je rod unutar porodice *Mycobacteriaceae* koja pripada redu *Actinomycetales*, a najnoviji dokazi sugeriraju da je nastao prije više od 245 milijuna godina (BEHR i GAGNEUX, 2011.; VELAYATI i FARNIA, 2016.; SURMIK i sur., 2018.).

Bakterije svrstane u ovaj rod su 1,0 – 10,0 µm dugi, 0,2 – 0,7 µm široki, aerobni, ravni ili blago zakrivljeni, nepokretni, acidorezistentni štapići koji ne tvore spore (NAGLIĆ i sur., 2005.). Karakteristično svojstvo mikobakterija je lipidima bogata stanična ovojnica koja se sastoji od citoplazmine membrane, stanične stijenke, površinskih lipida i kapsule, a prožeta je

kompleksima proteina odgovornima za održavanje oblika stanice tijekom dijeljenja. Citoplazmina membrana građena od dva sloja fosfolipida sadržava fosfatidilinozitol manozide, fosfolipide specifične za red *Actinomycetales*, i njihove derivate lipomanan i lipoarabinomanan. Na citoplazminu membranu naslanja se stanična stijenka čiji je unutarnji sloj građen od peptidoglikana, središnji od polisaharida arabinogalaktana, a vanjski od mikoličnih kiselina. U sloj mikoličnih kiselina interkalirani su glikolipidi, sulfolipidi, i inertni voskovi, a zajedno s njime čine takozvanu mikomembranu. Vanjski dio stanične ovojnice mikobakterija čini kapsula načinjena od polisaharida i proteina (CHIARDIA i sur., 2017.; ABRAHAMS i BESRA, 2018.; DULBERGER i sur., 2020.). Međutim, ovakav opis samo je okviran jer je stanična ovojnica dinamični sustav unutar kojeg se molekule konstantno gibaju iz jednog dijela u drugi. Konstantna rekonstrukcija stanične ovojnice omogućava mikobakterijama prilagođavanje okolišu u kojem se nalaze, a spojevi od kojih je građena odgovorni su za neka od najvažnijih svojstava mikobakterija poput acidorezistentnosti, morfologije kolonija, otpornosti na metale, dezinficijense i antibiotike, sposobnosti preživljavanja u makrofagima i mogućnosti manipulacije imunim sustavom domaćina (WOLFE i sur., 2010.; DULBERGER i sur., 2020.). Osim toga, neki od navedenih spojeva razmatraju se kao potencijalni antigeni pomoću kojih bi se unaprijedila postojeća dijagnostička sredstva i cjepiva ili proizvela nova (ANDERSEN, 1997.; SMITH, 2003.).

U rod *Mycobacterium* danas je svrstano više od 190 vrsta bakterija koje se dijele u tri skupine. U prvu skupinu, već spomenuti *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, svrstani su uzročnici tuberkuloze, a u drugu vrste *M. leprae* i *M. lepromatosis* koji uzrokuju lepru (gubu) u ljudi. Treću, ujedno i najveću skupinu, čine takozvane netuberkulozne mikobakterije (NTM), tj. mikobakterije prilagođene životu u okolišu, od kojih je određen broj potencijalno (oportunistički) patogen za životinje i ljude (CHIARADIA i sur., 2017.; RÖLTGEN i sur., 2020.; SHARMA i UPADHYAY, 2020.). Iako NTM ne uzrokuju tuberkulozu, infekcije uzrokovane tim mikobakterijama predstavljaju znatan problem jer uzrokuju lažno pozitivne rezultate pri dijagnostici tuberkuloze goveda TKT-om (ARANAZ i sur., 2006.; JENKINS i sur., 2018.).

U *Mycobacterium tuberculosis* kompleks svrstane su sljedeće vrste: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. munghi*, *M. orygis* i *M. suricattae* (SINHA i sur., 2016.). Pretpostavlja se da su sve ove vrste nastale prije 15000 - 35000 godina evolucijom zajedničkog pretka (DANIEL, 2006.). Unatoč tome što čine genetski vrlo homogenu skupinu koju karakterizira 99,9 %-tna sličnost na razini nukleotida, ove se bakterije znatno razlikuju prema tropizmu za domaćina, fenotipu i patogenosti

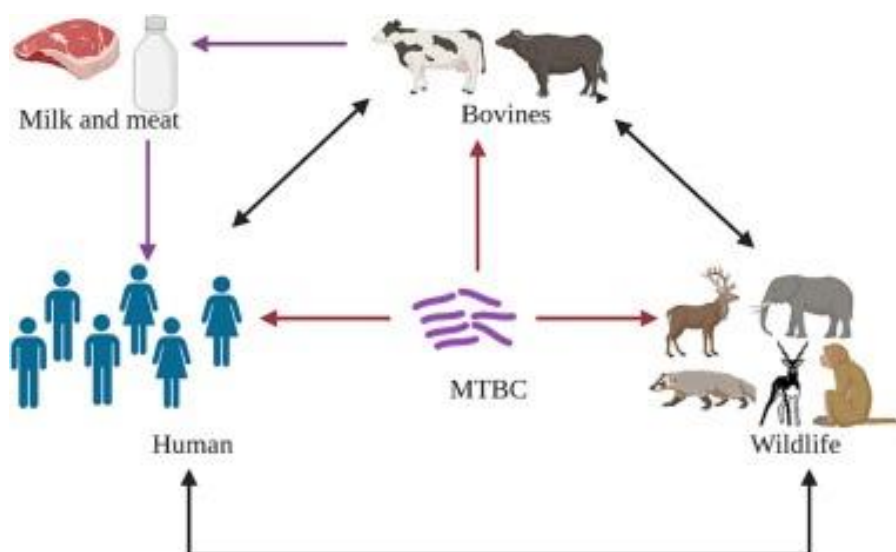
(BÖDDINGHAUS i sur., 1990.; SMITH i sur., 2009.; VELAYATI i FARNIA, 2016.; TEPPAWAR i sur., 2018.). Iako primarno patogena za goveda, vrsta *M. bovis* izdvojena je iz velikog broja domaćih i divljih životinja što ju čini vrstom s najširim rasponom domaćina, a u ljudi izaziva zoonotsku tuberkulozu. Vrsta *M. caprae* drugi je najčešći uzročnik tuberkuloze u goveda i drugi najčešći uzročnik zoonotske tuberkuloze u ljudi, međutim istraživanja pokazuju kako je slabo rasprostranjena izvan Europe (MÜLLER i sur., 2013.; PRODINGER i sur., 2014.). Osim iz goveda i čovjeka, izdvojena je i iz koza, domaćih i divljih svinja i jelena (CVETNIĆ, 2013.). Uz vrste *M. bovis* i *M. caprae* za humanu medicinu najvažnije vrste su *M. tuberculosis* koja uzrokuje većinu infekcija u ljudi, a za koju su prijemljiva i goveda, koze, magarci, konji, svinje, psi, mačke i divlje životinje poput slonova, jelena, antilopa i vodenih sisavaca, te vrste *M. africanum* i *M. canetti* izdvojene iz ljudi oboljelih od tuberkuloze na području Afrike, ali čiji prirodni rezervoari, prijemljive vrste i načini prijenosa nisu poznati (CVETNIĆ, 2013.; RODRIGUEZ-CAMPOS i sur., 2014.). Vrsta *M. microti* primarno je patogena za glodavce, ali može izazvati bolest i u imunokompromitiranih ljudi. Vrste *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungii* i *M. orygis* manje su značajne, a izdvojene su većinom iz divljih životinja poput tuljana, merkata, munogosa i pripadnika porodice šupljorožaca (BEHR i GAGNEUX, 2011.; RODRIGUEZ-CAMPOS i sur., 2014.; VELAYATI i FARNIA, 2016.).

2.1.3. Putevi prijenosa infekcije vrstom *M. bovis*

U prirodnim se uvjetima infekcija vrstom *M. bovis* može prenijeti s goveda na razne vrste domaćih i divljih životinja i obrnuto, te na čovjeka i vrlo rijetko s čovjeka na životinje ili s čovjeka na čovjeka (slika 1) (PHILIPS i sur., 2003.; SUNDER i sur., 2009.; SICHEWO i sur., 2020.; LOMBARD i sur., 2021.). Prijenos infekcije ovisi o mnogobrojnim čimbenicima poput trajanja izlučivanja bakterije, infektivnoj dozi, ulaznim vratima infekcije, trajanju kontakta i prijemljivosti domaćina (DHEDA i sur., 2010.; GOOD i DUIGNAN, 2011.).

Infekcija se među govedima, te s goveda na čovjeka, najčešće prenosi aerogeno udisanjem kontaminirane prašine ili aerosola, i oralno inficiranom hranom ili vodom kontaminiranom fecesom ili drugim izlučevinama koje sadrže uzročnika tuberkuloze (NEILL i sur., 1994.; PHILIPS i sur., 2003.). Poboljšanjem higijene hrane i uvođenjem prakse prokuhavanja ili pasterizacije mlijeka, kojeg se dugo smatralo glavnim izvorom infekcije za ljude, znatno je smanjena mogućnost prenošenja infekcije s goveda na čovjeka alimentarnim putem. Međutim, problem i dalje predstavljaju aerogene infekcije koje se javljaju u ljudi koji

rade u mesnoj industriji i klaonicama te u ljudi koji rade ili dijele mikrookoliš s domaćim ili divljim životinjama (BEZOS i sur., 2014b.; VAYR i sur., 2018.).



Slika 1. Načini prijenosa infekcije uzročnicima tuberkuloze (Izvor: RAMANUJAM i PALANIYANDI, 2023.).

Tuberkuloza je bolest koja sporo napreduje pa između infekcije i pojave prvih simptoma bolesti može proći mnogo vremena što pogoduje širenju bolesti. Mjesto ulaska u organizam domaćina, uz „obrambenu“ sposobnost imunskog sustava domaćina i virulenciju mikroorganizma, u najvećoj mjeri utječe na mjesto, prirodu i opseg patoloških promjena kao i na način izlučivanja mikobakterija iz inficiranog organizma (NEILL i sur., 1994.; KANEENE i PFEIFFER, 2006.).

2.1.4. Imunopatogeneza tuberkuloze

Većina spoznaja o imunskim reakcijama koje se odvijaju u organizmu domaćina nakon infekcije tuberkuloznim mikobakterijama temelji se na istraživanjima humane tuberkuloze i tuberkuloze pojedinih vrsta laboratorijskih životinja, dok je imunopatogeneza u domaćih životinja slabije razjašnjena (NEILL i sur., 1994.; CASSIDY, 2006.).

U imunskom odgovoru organizma na infekciju tuberkuloznim mikobakterijama sudjeluju mehanizmi urođene imunosti, koji podjednako djeluju na gotovo sve patogene mikroorganizme, i mehanizmi stečene imunosti, čije je djelovanje specifično, tj. usmjereno

samo na određene patogene mikroorganizme. Mehanizmi urođene i stečene imunosti su međusobno zavisni, a o odgovoru komponenata urođene imunosti ovisi oblikovanje stečene imunosti. Komponente urođene i stečene imunosti međusobno komuniciraju putem citokina, tj. sekrecijskih glikoproteina, koji se s obzirom na funkciju dijele na čimbenike rasta, kemokine, interleukine, interferone, faktore nekroze tumora, itd. (TIZARD, 2016c.). Urođena imunost predstavlja prvu liniju obrane organizma od raznih mikroorganizama i drugih noxi, a sačinjavaju je fizičke barijere (koža i sluznice), stanice imunosnog sustava poput mononuklearnih fagocita, granulocita i stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*, NK) te komponente humoralne imunosti, primjerice komplement i proteini akutne faze. Stečena imunost dijeli se na humoralnu, čiji su nosioci B-limfociti, i staničnu, čiji su nosioci T-limfociti. Prema diferencijacijskim skupinama, odnosno staničnim biljezima (engl. *cluster of differentiation*, CD) koje eksprimiraju na svojim membranama, T-limfocite možemo podijeliti na pomoćničke (eksprimiraju molekulu CD4) i citotoksične limfocite (eksprimiraju molekulu CD8). Za početak specifičnog imunosnog odgovora neophodna je aktivacija pomoćničkih T-limfocita koja se odvija u sekundarnim limfnim tkivima gdje im za to specijalizirane stanice urođene imunosti na svojoj površini u sklopu molekula tkivne podudarnosti tipa II prikazuju obrađene antigene (DAY i SCHULTZ, 2013a). Nadalje, aktivirani pomoćnički T-limfociti oslobađaju citokine koji utječu na daljnji tijek imunosnog odgovora, a prema kojima se dijele na nekoliko podtipova: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 i Tfh (CANO i LOPERA, 2013.). Aktivacija mehanizama stečene imunosti dovodi do imunološkog pamćenja, tj. stvaranja klonova imunosnih stanica specifičnih za određeni antigen, koje omogućava specifični, brži i učinkovitiji odgovor organizma kod sljedećeg susreta s istim antigenom (DAY i SCHULTZ, 2013a.).

Glavnu ulogu u obrani organizma od unutarstaničnih patogenih mikroorganizama poput tuberkuloznih mikobakterija ima stanična imunost čiji su nosioci Th1-limfociti. Međutim, ključnim stanicama u odgovoru domaćina na infekciju mikobakterijama smatraju se makrofagi koji su dio nespecifične urođene imunosti, a u kojima mikobakterije mogu preživljavati zahvaljujući svojoj acidorezistentnoj voštanoj ovojnici (PARLANE i BUDDLE, 2015.). Makrofagi su mononuklearni fagociti koji se nalaze u raznim tkivima, a čija je osnovna funkcija uklanjanje patogenih mikroorganizama, mrtvih i oštećenih stanica te drugih stranih tvari iz organizma. Nadalje, oni djeluju kao spona između urođene i stečene imunosti jer kao i dendritične stanice imaju sposobnost obrade i prikazivanja antigena T-limfocitima (TIZARD, 2016a.). Fagocitirane mikrobe makrofagi uništavaju pomoću lizosomalnih hidrolitičkih enzima, reaktivnih kisikovih i dušikovih metabolita ili antibakterijskih peptida (WEISS i

SCHAIBLE, 2015.). Međutim, uloga makrofaga u ovom slučaju pomalo je paradoksalna jer iako diktiraju smjer infekcije i razvoj stečene imunosti i ključni su čimbenik za razvoj zaštitne imunosti, također pridonose uspostavljanju infekcije omogućavajući mikobakterijama preživljavanje i umnažanje (MARTINO, 2008.; MAYER-BARBER i BARBER, 2015.). U slučaju da mehanizmi nespecifične urođene imunosti nakon infekcije ne uspiju eliminirati mikobakterije, u ljudi se razvija klinički manifestna bolest ili, u većini slučajeva, infekcija prelazi u latentnu infekciju koja se može, ili ne mora, ponovno aktivirati tijekom života zbog nekih pogodovnih čimbenika. Međutim, postojanje latentne infekcije u goveda još je uvijek predmet rasprave u znanstvenim krugovima (GARCIA i sur., 2020.; NCUBE i sur., 2022.). Kako infekcija napreduje tako organizam domaćina razvija preosjetljivost na uzročnike tuberkuloze, stoga imunosna reakcija koja je u početku korisna s vremenom prerasta u po organizam štetnu reakciju odgovornu za većinu nastalih patoloških promjena (MAYER-BARBER i BARBER, 2015.). Međutim, zbog provođenja programa nadzora i iskorjenjivanja tuberkuloze u goveda, većina grla inficiranih tuberkuloznim mikobakterijama otkriva se i usmrćuje tijekom ranih faza infekcije stoga su u goveda nakon razudbe rijetko vidljive promjene karakteristične za kasnije stadije bolesti (DANNENBERG, 1991.; NEILL i sur., 1994.; VAN CREVEL, 2002.; CASSIDY, 2006.).

Na mjestu prvotnog umnažanja mikobakterije u organizmu, koje se u goveda s obzirom na najučestaliji put infekcije najčešće nalazi u plućima, mikobakterije dolaze u doticaj s rezidualnim makrofagima i drugim stanicama urođene imunosti. Posredstvom površinskih receptora za prepoznavanje uzoraka patogena, poput primjerice Toll-like receptora (TLR), receptora za manozu i komponenti komplemента, makrofagi prepoznaju specifične molekularne obrasce specifične za mikobakterije. Tada započinje proces fagocitoze pri čemu se oslobađa niz proupalnih citokina koji potiču migraciju i nakupljanje drugih imunosnih stanica na mjestu upale (SMITH, 2003.; DHEDA i sur., 2010.). Neutralizacija mikobakterija u ovoj fazi ovisi o intrinzičnoj mikrobicidnoj sposobnosti makrofaga domaćina te virulenciji fagocitiranih mikobakterija. Ako makrofagi ne uspiju uništiti mikobakterije, započinje drugi stadij infekcije kojeg karakterizira naglo umnažanje mikobakterija zbog kojeg inficirani makrofagi pucaju što uzrokuje širenje infekcije (DANNENBERG, 1991.). Inficirani makrofagi i dendritične stanice migriraju u područne limfne čvorove gdje prikazivanjem obrađenih antigena mikobakterija na svojoj površini i oslabođanjem citokina interleukin (IL)-12 i IL-18 započinju aktivaciju mehanizama stanične imunosti i diferencijaciju pomoćničkih T-limfocita u Th1-limfocite (KOBAYASHI i sur., 2001.; VAN CREVEL, 2002.). Međutim, mikobakterije su sposobne razviti mehanizme pomoću kojih mogu prolongirati proces aktivacije stanične

imunosti u svakoj prethodno opisanoj fazi, primjerice sprječavanjem sazrijevanja fagosoma ili maskiranjem svojih antigena, tj. sprječavanjem njihova prikazivanja T-limfocitima (DEY i BISHAI, 2014.). Th1-limfociti migriraju na mjesto upale gdje funkcionalno sazrijevaju te počinju oslobađati citokin interferon gama (engl. *interferon-gamma*, IFN- γ) koji djeluje na aktivaciju makrofaga te im pojačava mikrobicidnu sposobnost. U ovoj fazi inficirane jedinke postaju preosjetljive na mikobakterije stoga ih je moguće otkriti pomoću TKT-a (TIZARD, 2016b.). Aktivacija makrofaga posredovana Th1-limfocitima je ključna međustanična reakcija za uspostavu imunološke kontrole nad infekcijom mikobakterijama, međutim vrijeme koje prođe od početka infekcije do dolaska Th1-limfocita na mjesto upale doprinosi nesposobnosti domaćina da suzbije infekciju jer omogućava mikobakterijama da se umnože u velikom broju prije nego li se aktiviraju mehanizmi stečene imunosti (MAYER-BARBER i BARBER, 2015.).

Uslijed kronične antigenske stimulacije i nakupljanja imunskih stanica na mjestu infekcije dolazi do formiranja tuberkula, tj. granuloma ili „čvorića“ karakterističnih za tuberkulozu, čiji je cilj ograničavanje infekcije. Granulomi su u početku građeni od inficiranih makrofaga okruženih slojem neutrofila i limfocita, a napredovanjem infekcije njihova građa postaje sve kompleksnija. Makrofagi se transformiraju u epitelioidne makrofage i divovske stanice, a u centru čvorića se razvija kazeozna nekroza koja je rezultat uništavanja neaktiviranih makrofaga. Na ovaj način, uništavanjem vlastitog tkiva, organizam pokušava eliminirati unutarstanični okoliš koji pogoduje umnažanju mikobakterija (DANNENBERG, 1991.; LYADOVA, 2012.; PARLANE i BUDDLE, 2015.). Sve dok imunski sustav domaćina nije kompromitiran, nastala žarišta su neaktivna, tj. mikobakterije u njima opstaju, ali ne uzrokuju patološke promjene. Međutim ukoliko iz nekog razloga imunski sustav domaćina oslabi, dolazi do narušavanja strukture granuloma te se mikobakterije počinju krvlju i limfom širiti po organizmu što dovodi do brze progresije bolesti (TIZARD, 2016b.).

2.1.5. Dijagnostika tuberkuloze u goveda i programi iskorjenjivanja

S obzirom na to da tuberkuloza goveda uzrokuje velike gospodarske štete te da zaražena goveda predstavljaju mogući izvor infekcije za druge životinje i ljude, većina razvijenih zemalja provodi nacionalne programe iskorjenjivanja ove bolesti. Pojedine europske zemlje, poput Finske, s programom iskorjenjivanja započele su već krajem 90-ih godina 19. stoljeća, a 1964. godine, tj. ubrzo nakon osnivanja Europske ekonomske zajednice usvojene su i prve zakonodavne inicijative čiji je cilj bio spriječiti širenje tuberkuloze prometom stoke (ANONIMNO, 2024a.). Prema današnjem zakonodavnom okviru Europske unije (EU), sve

zemlje članice moraju provoditi programe nadzora i iskorjenjivanja tuberkuloze goveda koje je odobrila Europska Komisija (EK), s ciljem stjecanja i održavanja statusa država službeno slobodnih od tuberkuloze. Navedeni status trenutno ima 17 zemalja članica EU, a tri zemlje članice postigle su ga za dio svog teritorija (ANONIMNO, 2024a.). U Republici Hrvatskoj obavezno testiranje goveda na tuberkulozu provodi se od 1910. godine (CVETNIĆ, 2013.), međutim testiranje u svrhu stjecanja navedenog statusa sukladno smjernicama EK započelo je odlukom Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja u listopadu 2009. godine (ŠPIČIĆ i sur., 2011.).

Programi iskorjenjivanja temelje se na „*test and slaughter*“ metodi, tj. na redovnom godišnjem testiranju svih goveda starijih od 6 tjedana te usmrćivanju pozitivnih jedinki, i pojačanom veterinarsko-sanitarnom nadzoru u klaonicama. Testiranje se provodi *in vivo* TKT-om ili *in vitro* testom oslobađanja interferona gama. U oba navedena testa kao dijagnostičko sredstvo koristi se pripravak tuberkulinski PPD, međutim on se u testu oslobađanja interferona gama može zamijeniti određenim mikobakterijskim peptidnim antigenima. Konačna dijagnoza postavlja se bakteriološkom ili molekularnom identifikacijom uzročnika tuberkuloze izdvojenih iz limfnih čvorova i parenhimskih organa uginulih ili usmrćenih životinja (ANONIMNO, 2023c.).

2.1.5.1. Tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat i razvoj tuberkulinskog kožnog testa

Tuberkulinski PPD je dijagnostički pripravak koji se ubrizgava u kožu čovjeka ili životinje tijekom provođenja TKT-a. Prvu verziju ovog dijagnostičkog pripravka, koja se prema načinu proizvodnje i sastavu znatno razlikovala od današnje, proizveo je 1890. godine Robert Koch, njemački mikrobiolog, koji je nekoliko godina ranije otkrio i uspješno izdvojio bakteriju *Mycobacterium tuberculosis*. Koch je tijekom niza pokusa provedenih na laboratorijskoj zamorčadi zaraženoj tuberkulozom primijetio kako reinfekcija ne dovodi do pogoršanja i ubrzanja tijeka bolesti već do nekroze inficiranih tkiva. Pokus je ponovio ubrizgavajući zaraženim životinjama pripravak koji je nazvao tuberkulin, a koji je dobio zagrijavanjem, uparavanjem i filtriranjem glicerinskog bujona na kojemu je tijekom 6 - 8 tjedana uzgajao bakteriju *Mycobacterium tuberculosis*, te došao do istih rezultata (BOTHAMLEY i GRANGE, 1991.; GRADMANN, 2006.). Kochov tuberkulin bio je sirova smjesa proteina i drugih makromolekula dobivenih od bakterije koja je rasla u bujonu, a čiji je sastav varirao između različitih serija (MONAGHAN i sur., 1994.; YANG i sur., 2012.). Vjerujući kako je pronašao lijek za tuberkulozu, Koch je u srpnju 1890. godine na 10. Međunarodnom medicinskom

kongresu održanom u Berlinu objavio rezultate svojih istraživanja te se tuberkulin već u studenom iste godine počeo primjenjivati u praksi. Pacijentima se u određenim intervalima davalo nekoliko doza Kochovog tuberkulina u kožu na području između lopatica i lumbalnog dijela leđa, a doze su se povećavale. Samo nekoliko mjeseci kasnije, u proljeće 1891. godine, nakon brojnih izvješća o neučinkovitosti liječenja te velikog broja prijavljenih nuspojava, poput lokalnih upalnih reakcija ili nekroze na mjestu primjene te ozbiljnih sistemskih reakcija poput vrućice, bolnosti u prsima, oticanja limfnih čvorova i iskašljavanja krvi, ali i velikog broja smrtnih ishoda, postalo je jasno kako tuberkulin nema terapijsku vrijednost (VILAPLANA i CARDONA, 2012.). Iako, unatoč brojnim dokazima, u to vrijeme u znanstvenoj zajednici još uvijek nije postojao konsenzus oko mogućnosti prijenosa tuberkuloze s goveda na čovjeka, veterinari su zbog golemih ekonomskih šteta koje je tuberkuloza goveda nanosila stočarstvu već započeli s intenzivnim nadzorom i pokušajima iskorjenjivanja ove bolesti. Nadzor se obavljao redovnim kliničkim pregledima goveda, čiji je cilj bio otkrivanje jedinki sa simptomima tuberkuloze, redovnim bakteriološkim pregledima uzoraka mlijeka te dobrovoljnim klanjem oboljelih životinja (DE LA RUA-DOMENECH i sur., 2006.). Međutim, McFadyean je 1891. godine proveo istraživanje tijekom kojeg se pokazalo kako se u oboljelih goveda tijekom nekoliko sati nakon primjene tuberkulina javljaju porast temperature i oteklina na mjestu primjene, a u zdravih goveda ne. Temeljem navedenog istraživanja veterinari su prepoznali dijagnostički potencijal tuberkulina te ga počeli koristiti kao dijagnostičko sredstvo u programima iskorjenjivanja tuberkuloze. Ovi programi temeljili su se na mjerenju temperature goveda prije i u redovnim intervalima tijekom 24 sata nakon primjene Kochovog tuberkulina. Tuberkulin se govedima primjenjivao pod kožu na području desne lopatice, a testiranje se ponavljalo svakih 6 mjeseci. Nakon svakog testiranja pozitivna goveda (ona koja su pokazivala gore opisane simptome) izlučivala su se iz stada. Iako je takav način testiranja iziskivao mnogo vremena, bio zahtjevan i skup za izvođenje te znatno ovisio o stručnosti i znanju veterinara koji ga je provodio, pokazao se vrlo korisnim te se u zemljama gdje se provodio incidencija tuberkuloze znatno smanjila (GOOD i sur., 2018.).

Tijekom narednih godina, mnogobrojni znanstvenici su u pokušaju da usavrše dijagnostički postupak te povećaju njegovu specifičnost i osjetljivost počeli istraživati različite tehnike i načine primjene tuberkulina, dok su drugi, uključujući i samog Kocha, nastavili s istraživanjima čiji je cilj bio standardizacija proizvodnje i poboljšanje kvalitete tuberkulina što je u konačnici rezultiralo hiperprodukcijom proizvoda koji su se međusobno razlikovali po načinu pripreme i daljnje obrade (VILAPLANA i CARDONA, 2012.; GOOD i sur., 2018.). Austrijski znanstvenik i pedijatar Clemens von Pirquet je na temelju zaključaka koje je donio

proučavajući reakcije pacijenata na primjenu konjskog seruma i cjepiva protiv boginja, točno pretpostavio kako su reakcije koje se javljaju u pacijenata oboljelih od tuberkuloze nakon primjene tuberkulina posljedica promijenjene reaktivnosti organizma na sekundarni kontakt s antigenom, tj. imunosne reakcije koju je nazvao alergija. Ovu spoznaju iskoristio je kako bi među pacijentima Bečke pedijatrijske klinike otkrio one koji su inficirani uzročnikom tuberkuloze, ali ne pokazuju kliničke znakove bolesti. Na malu površinu prethodno blago izgrebane kože pacijenata utrljavao je jednu kap Kochovog tuberkulina, a na mjestu primjene su se u onih inficiranih uzročnikom tuberkuloze javljali crvenilo i otekline. Von Pirquetova metoda bila je jednostavna i brza za izvođenje, nije izazivala nuspojave te je bila znatno jeftinija od ostalih metoda jer je za izvedbu bilo potrebno znatno manje tuberkulina (SHULMAN, 2017.). Nekoliko godina kasnije njegovu metodu usavršili su njemački liječnik Felix Mendel i francuski liječnik Charles Mantoux koji su prvi opisali intradermalnu primjenu tuberkulina pomoću brizgaljke (LANGE i SESTER, 2012.). Daljnja istraživanja usmjerila su se prema određivanju najpogodnijeg mjesta primjene te se uskoro pokazalo kako je osjetljivost testa najveća kada se tuberkulin primjenjuje u kožu vrata goveda, i to onih dijelova vrata bliže glavi. Unatoč tome, u pojedinim zemljama svijeta, primjerice u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), tuberkulin se i danas ubrizgava u nabor kože na repu goveda (GOOD i sur., 2018.).

S druge strane, prvi značajniji iskorak prema poboljšanju kvalitete tuberkulina napravljen je 30-ih godina prošlog stoljeća kada su u primjenu uvedene sintetičke podloge za uzgoj mikobakterija. Tuberkulini proizvedeni na njima nisu sadržavali proteine podrijetlom iz podloga što je rezultiralo smanjenjem broja nespecifičnih reakcija (MONAGHAN i sur., 1994.). Tuberkulin kakav danas poznajemo proizvela je 1941. godine biokemičarka Florence B. Siebert s Instituta Henry Phipps u Pennsylvaniji pročišćavanjem tuberkuloproteina uzastopnom percipitacijom pomoću amonijevog sulfata. Percipitacijom su iz tuberkulina uklonjeni proteini velike molekularne mase koji su u pacijenata kojima je tuberkulin primijenjen izazivali senzibilizaciju. Tuberkulin pripremljen na ovaj način imao je ujednačeniji sastav te bio znatno stabilniji, a s obzirom na to da je sadržavao čak 92,9 % proteina te samo 5,9 % polisaharida i 1,2 % nukleinskih kiselina, nazvan je tuberkulinski pročišćeni proteinski derivat (YANG i sur., 2012.)

Kako bi se dodatno povećala specifičnost testa, tj. smanjio broj nespecifičnih reakcija, 1942. godine se počeo primjenjivati pojedinačni komparativni intradermalni cervikalni test tijekom kojeg su se govedima istovremeno primjenjivala dva tuberkulinska PPD-a, jedan pripremljen od bakterije *M. tuberculosis* i jedan pripremljen od bakterije *M. avium* koji pripada NTM skupini mikobakterija. Komparativni intradermalni cervikalni test omogućio je

razlikovanje goveda inficiranih tuberkuloznim mikobakterijama od onih inficiranih s NTM iz okoliša. U goveda inficiranih tuberkuloznim mikobakterijama reakcija na tuberkulinski PPD pripravljen od bakterije *M. tuberculosis* bila je jača od reakcije na tuberkulinski PPD pripravljen od bakterije *M. avium*, dok je u životinja senzibiliziranih s NTM jača bila reakcija na tuberkulinski PPD pripravljen od bakterije *M. avium*. Nedugo zatim, tuberkulinski PPD pripravljen od bakterije *M. tuberculosis* u dijagnostici tuberkuloze u goveda zamijenjen je tuberkulinskim PPD-om pripravljenim od bakterije *M. bovis* čime su dodatno povećane specifičnost i osjetljivost testa (MONAGHAN i sur., 1994; DE LA RUA-DOMENECH i sur., 2006.; COAD i sur., 2010.).

Danas se u dijagnostici koriste tri vrste tuberkulinskih PPD-a koje se međusobno razlikuju prema vrsti mikobakterije od koje su spravljene: humani (hPPD), bovini (bPPD) i avijarni (aPPD). Humani PPD se koristi za dijagnostiku tuberkuloze u ljudi, a bPPD i aPPD za dijagnostiku tuberkuloze u goveda te prema potrebi drugih domaćih i divljih životinja, poput malih preživača, svinja, jelena, itd. (ANONIMNO, 2023c.). Međutim, mjesto primjene tuberkulinskog PPD-a i očitavanje rezultata TKT-a u pojedinim vrsta drugačiji su nego u goveda, a detalji se mogu naći u Kodeksu o zdravlju kopnenih životinja dostupnom na mrežnim stranicama Svjetske organizacije za zdravlje životinja (engl. *World Organisation for Animal Health*, WOAHA). Proizvodnja tuberkulinskih PPD-a je standardizirana, a prema Europskim propisima to su proizvodi koji podliježu postupku odobravanja (registraciji) te se moraju proizvoditi u skladu s dobrom proizvođačkom praksom i ispunjavati uvjete koje propisuju WOAHA i Europska farmakopeja (engl. *European Pharmacopeia*, Ph. Eur.). Prema definiciji Ph. Eur. tuberkulinski PPD-i su dijagnostički pripravci dobiveni termičkom obradom produkata rasta i lize mikobakterija koji u ljudi ili životinja senzibiliziranih mikroorganizmima iste vrste mogu izazvati reakciju kasne preosjetljivosti. Tuberkulinski PPD-i proizvode se od u vodi topljivih frakcija pripremljenih zagrijavanjem u slobodno strujećoj pari i naknadnim filtriranjem kultura mikobakterija uzgajanih u tekućem sintetskom mediju. Aktivna frakcija filtrata, koja se sastoji uglavnom od proteina, izdvaja se precipitacijom, ispire i ponovno otapa. U proizvod se može dodati antimikrobni konzervans koji ne izaziva pojavu lažno pozitivnih reakcija, primjerice fenol. Na ovaj način proizvedeni sterilni proizvod, koji ne sadržava mikobakterije, puni se aseptički u sterilne staklene spremnike i potom zatvara radi sprječavanja kontaminacije. Gotovi proizvod može se liofilizirati. Bovini tuberkulinski PPD-i proizvode se od soja AN5 bakterije *M. bovis*, a avijarni od sojeva D4ER ili TB56 bakterije *M. avium* (DE LA RUA-DOMENECH i sur., 2006.; BEZOS i sur., 2014a.).

2.1.5.2. Postupak provođenja tuberkulinskog kožnog testa u goveda i očitavanje rezultata

Postupak provođenja TKT-a i očitavanje rezultata opisani su u standardnoj operativnoj proceduri (SOP/001/EURL) objavljenoj na mrežnim stranicama EU referentnog laboratorija za tuberkulozu goveda.

Ukratko, TKT se provodi ubrizgavanjem tuberkulinskog PPD-a u prethodno očišćenu kožu na granici prednje i srednje trećine vrata goveda pomoću za to namijenjene opreme. Kod usporednog testa u goveda aPPD se primjenjuje oko 10 cm dalje od grebena vrata, a bPPD oko 12,5 cm niže na liniji otprilike paralelnoj s linijom ramena ili na suprotnim stranama vrata, a ako na jednoj strani vrata goveda nema dovoljno prostora za odvajanje mjesta ubrizgavanja, bPPD i aPPD se ubrizgavaju na različite strane vrata, i to na identičnim mjestima u središtu srednje trećine vrata. Prije ubrizgavanja tuberkulinskog PPD-a na predviđenom mjestu ubrizgavanja pomoću kutomjera izmjeri se debljina kožnog nabora, a nakon ubrizgavanja palpacijom se provjerava da li se na mjestu ubrizgavanja razvila otekline veličine graška čime se utvrđuje ispravnost postupka. Na temelju kliničkog pregleda otekline na mjestu ubrizgavanja, pregleda područnih limfnih čvorova i razlike u debljini kožnog nabora prije ubrizgavanja i 72 ± 4 sata nakon ubrizgavanja tuberkulinskog PPD-a utvrđuje se da li je rezultat testa pozitivan, sumnjiv ili negativan (tablica 1.).

Tablica 1. Kriteriji prema kojima se utvrđuju rezultati tuberkulinskog kožnog testa

Rezultat	Test	
	Pojedinačni (bPPD)	Usporedni (bPPD i aPPD)
Pozitivan	Klinički znakovi*: DA ili Razlika u debljini kožnog nabora prije i poslije primjene bPPD-a: ≥ 4 mm	Klinički znakovi: DA ili Kožni nabor na mjestu primjene bPPD-a za više od 4 mm deblji nego na mjestu primjene aPPD-a
Sumnjiv	Klinički znakovi: NE Razlika u debljini kožnog nabora prije i poslije primjene bPPD-a: 2 - 4 mm	Klinički znakovi: NE Pozitivna ili sumnjiva reakcija na bPPD koja je za 1 - 4 mm veća od reakcije na aPPD
Negativan	Klinički znakovi: NE (samo ograničena otekline) Razlika u debljini kožnog nabora prije i poslije primjene bPPD-a: < 2 mm	Klinički znakovi: NE Negativna reakcija na bPPD ili pozitivna/sumnjiva reakcija na bPPD koja je jednaka ili manja od pozitivne/sumnjive reakcije na aPPD

* difuzni ili jaki edem, eksudacija, nekroza, bol ili upala limfnih kanala ili limfnih čvorova

U slučaju da je rezultat usporednog testa pozitivan govedo se upućuje na klanje. Goveda pozitivna na pojedinačnom testu, u slučaju sumnje na interferenciju ili lažno pozitivan rezultat, i goveda sumnjiva na pojedinačnom testu te ona sa sumnjivim rezultatom na usporednom testu, kada se on provodi s ciljem dodjele ili održavanja statusa stada, ponovno se podvrgavaju testiranju 42 dana nakon prvog testa. Sva goveda koja na ponovljeni test daju pozitivnu ili sumnjivu reakciju upućuju se na klanje. Iznimno, ako goveda čiji su rezultati nakon pojedinačnog testa pozitivni ili sumnjivi te ona čiji su rezultati nakon prvog usporednog testa sumnjivi dolaze iz stada u kojima je tuberkuloza već potvrđena, ne testiraju se ponovno već se odmah nakon prvog testa upućuju na klanje.

2.1.5.3. Reakcija kasne preosjetljivosti

Tuberkulinski kožni test temelji se na imunosnoj reakciji nazvanoj preosjetljivost tipa IV. Preosjetljivostima se nazivaju neprimjereno jake reakcije imunosnog sustava na ponovni kontakt s antigenom na koji je organizam tijekom prethodnog kontakta senzibiliziran, a koje za posljedicu imaju oštećenje tkiva. Prema klasifikaciji Philipa Gella i Roberta Combsa iz 1963. godine reakcije preosjetljivosti se po načinu nastanka, tipu imunosne reakcije kojom su posredovane i patofiziološkim mehanizmima koji dovode do oštećenja tkiva dijele na četiri tipa (DAY i SCHULTZ, 2013b.; DISPENZA, 2019.), međutim klinički se uz tip koji prevladava redovito javljaju i drugi oblici preosjetljivosti (UZZAMAN i CHO, 2013.). Nosioči prva tri tipa preosjetljivosti (tip I ili anafilaksijski tip posredovan IgE, tip II ili citotoksični tip i tip III ili preosjetljivost posredovana imunokompleksima) su protutijela, a simptomi se očituju ubrzo nakon ponovnog unošenja antigena u senzibilizirani organizam pa se stoga ovi tipovi preosjetljivosti nazivaju još i rane preosjetljivosti. Za razliku od toga, reakcija preosjetljivosti tipa IV je stanična preosjetljivost u kojoj ne sudjeluju protutijela već antigen specifični T-limfociti. S obzirom na to da se simptomi ovog tipa reakcije očituju tek 24 - 72 sata nakon unošenja antigena u prethodno senzibilizirani organizam, preosjetljivost tipa IV naziva se još i kasna preosjetljivost. Kasnu preosjetljivost najčešće izazivaju antigeni bjelančevinske građe kao i hapteni koji se vežu na bjelančevinske nosače, a javlja se kod infekcija unutarstaničnim bakterijama i gljivicama te nekim virusima i parazitima, nakon izlaganja nekim lijekovima i kemikalijama, ali i nakon transplantacije organa (MARWA i KONDAMUDI, 2021.). S obzirom na podtip T-limfocita kojom su posredovane te citokinima koje on oslobađa, reakcije kasne preosjetljivosti dijele se na četiri podtipa (IVa – IVd). Citokini koji se izlučuju tijekom reakcije kasne preosjetljivosti određuju opseg i kvalitetu upalnog infiltrata te trajanje njegovog

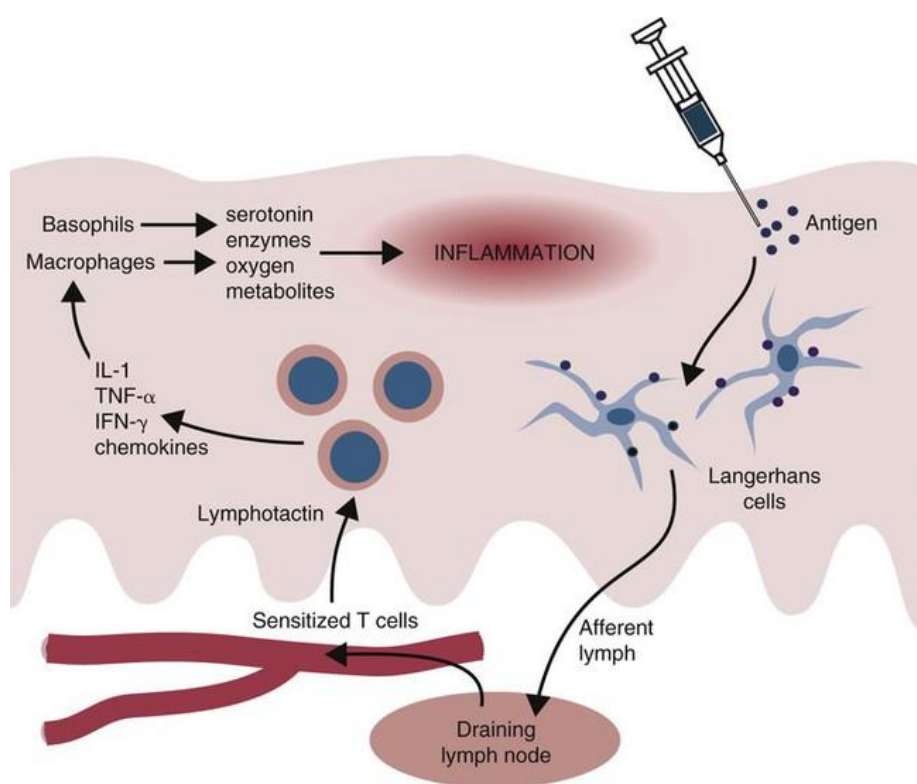
zadržavanja na mjestu reakcije (KOBAYASHI i sur., 2001.). Reakcija na tuberkulinski PPD svrstana je u podtip IVa koji je posredovan Th1-limfocitima čiji je efektorski citokin IFN- γ , a karakterizira ga nakupljanje i aktivacija makrofaga (PICHLER, 2003.; CZARNOBILSKA i sur., 2007., UZZAMAN i CHO, 2013.).



Slika 2. Reakcije kasne preosjetljivosti na mjestima primjene aPPD (gornja oteklina) i bPPD (donja oteklina) u goveda inficiranog tuberkuloznim mikobakterijama (Izvor: dr. sc. Silvio Špičić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju)

Reakcija preosjetljivosti kasnog tipa odvija se u dvije faze. Nakon prvog kontakta organizma s antigenom, u ovom slučaju uzročnikom tuberkuloze, dolazi do senzibilizacije organizma (vidjeti odjeljak 2.1.4.), tj. do diferencijacije djevičanskih T-limfocita u antigen specifične Th1-limfocite, njihove proliferacije te distribucije po tkivima. Veći dio tih limfocita s vremenom odumre, međutim, manji dio opstaje u obliku dugoživućih memorijskih Th1-limfocita koji cirkulirajući krvlju obavljaju stalni imunosni nadzor u svim dijelovima tijela. Nakon što se u kožu senzibiliziranog organizma ubrizga tuberkulinski PPD, iz memorijskih limfocita nastaje velik broj izvršnih Th1-limfocita. Oni počinju oslobađati citokine IL-2, koji potiče njihovu daljnju proliferaciju i diferencijaciju, i IFN- γ , koji aktivira makrofage. Nakon aktivacije, makrofagi počinju pojačano proizvoditi reaktivne metabolite kisika i dušika te

oslobađati proupalne citokine tumor nekrotizirajući faktor α (TNF- α), IL-1 i IL-6 koji potiču sintezu vazodilatatora u endotelu krvnih žila čime se olakšava dotok novih imunosnih stanica na mjesto upale. Na aktiviranom endotelu pojačava se ekspresija adhezijskih molekula koje vežu imunosne stanice iz periferne krvi i omogućavaju njihovu migraciju iz krvnih žila u tkivo. Također, zbog opuštanja veza među endotelnim stanicama krvne žile postaju propustljivije za makromolekule plazme poput fibrinogena. Povećana propustljivost krvnih žila, deponiranje fibrina, nakupljanje upalnih stanica i oslobađanje citokina, lizosomalnih enzima, komponenti komplementa i reaktivnih metabolita kisika uzrokuju oštećenje tkiva, crvenilo i oteklinu na mjestu primjene tuberkulinskog PPD-a (slike 2 i 3) (BLACK, 1999., TIZARD 2016b.).



Slika 3. Mehanizam nastanka reakcije kasne preosjetljivosti kod tuberkulinskog kožnog testa (Izvor: TIZARD, 2016b.)

2.1.5.4. Kontrola tuberkulinskih pročišćenih proteinskih derivata

Kako bi bili sigurni u ispravnost dijagnostike tuberkuloze, a time i učinkovitost programa njezina iskorjenjivanja, nužno je prije stavljanja na tržište kontrolirati kvalitetu svake

nove serije tuberkulinskih PPD-a. Specifikacije koje prema zahtjevima WOHAT i Ph. Eur. moraju ispunjavati bPPD-i prikazane su u tablici 2. (ANONIMNO, 2019a.; ANONIMNO, 2023c.).

Tablica 2. Kontrolni parametri i specifikacije kojima moraju udovoljavati bPPD-i prije stavljanja na tržište

Kontrolni parametar	Specifikacija
Identifikacija	24 do 28 sati nakon primjene bPPD-a senzibiliziranim zamorčicama na mjestu primjene se javljaju reakcije u obliku edema s crvenilom sa ili bez nekroze. Veličina i intenzitet reakcija varira ovisno o primjenjenoj dozi. Navedene reakcije ne javljaju se nakon primjene bPPD-a nesenzibiliziranim zamorčicama.
pH	6,5 - 7,5
Sadržaj fenola*	najviše 5 g/L
Senzibilizirajući učinak	bPPD ne smije imati senzibilizirajući učinak
Toksičnost	bPPD ne smije uzrokovati neželjene reakcije nakon primjene u kožu
Sterilnost	bPPD mora biti sterilan
Aktivnost**	deklarirana aktivnost nije manja od 20000 i.j./mL

* parametar primjenjiv samo za bPPD-e koji sadržavaju fenol

** Test nije valjan osim ako interval pouzdanosti ($P = 0,95$) nije manji od 50 % niti veći od 200 % deklarirane aktivnosti. Procijenjena aktivnost nije manja od 66 % niti veća od 150 % deklarirane aktivnosti bPPD-a.

Biološka aktivnost, tj. sposobnost tuberkulinskog PPD-a da u senzibiliziranom organizmu izazove reakciju, najvažniji je pokazatelj kvalitete tuberkulinskih PPD-a jer o njoj ovisi učinkovitost TKT-a. Upotreba tuberkulinskih PPD-a čija je aktivnost veća od one na koju bi reagirala većina inficiranih životinja povećava osjetljivost testa te omogućava detekciju najvećeg mogućeg broja zaraženih grla čime se pospješuje iskorjenjivanje bolesti (DUIGNAN i sur., 2019.). S obzirom na to da sadržaj proteina tuberkulinskih PPD-a, prema kojemu ih je moguće standardizirati, ne odražava njihovu aktivnost, nju je potrebno kontrolirati biološkim

pokusom (HAAGSMA, 1986.). Biološki pokus je trenutno jedina odobrena metoda kontrole aktivnosti tuberkulinskih PPD-a koja se rutinski provodi na zamorčadi. Osim aktivnosti na ovaj način kontroliraju se i parametri identifikacija, senzibilizirajući učinak i toksičnost, dok se preostali parametri kontroliraju klasičnim laboratorijskim kemijsko-fizikalnim metodama. Metode kontrole svih parametara detaljno su opisane u Ph. Eur. monografiji 01/2008:0536. Kontrola aktivnosti tuberkulinskih PPD-a se, kao i TKT, temelji na reakciji kasne preosjetljivosti, a crvenilo i otekline koji se javljaju na koži senzibilizirane zamorčadi nakon primjene tuberkulinskog PPD-a rezultat su lokalnog stanično posredovanog sekundarnog (memorijskog) imunskog odgovora na ponovni kontakt s antigenom (VUKMANOVIĆ-STEJIĆ i sur., 2006.). Biološka aktivnost ispitivanog bPPD-a se određuje usporedbom promjera reakcija nastalih na mjestima njegove primjene s promjerima reakcija nastalih na mjestima primjene međunarodnog standarda bPPD-a pomoću statističkog programa CombiStats razvijenog posebno u svrhu statističke analize podataka dobivenih u postupcima određivanja aktivnosti bioloških pripravaka (ANONIMNO, 2019a., ANONIMNO, 2024b.). Usporedba s međunarodnim referentnim standardima koje je odredio WHO osigurava uniformnost kvalitete tuberkulinskih PPD-a diljem svijeta. Aktivnost tuberkulinskih PPD-a izražava se u internacionalnim jedinicama (i.j.) u mL proizvoda. Internacionalne jedinice su mjera biološke aktivnosti u deklariranoj količini referentnog standarda (ANONIMNO, 2019a.). Kao međunarodni referentni standard bPPD-a 1986. godine odabran je Nizozemski PPD proizveden od soja AN5 *M. bovis* čija je aktivnost 32500 i.j./mL (DUIGNAN i sur., 2019.). Međutim, kako su zalihe navedenog standarda ograničene, WOAHA je formirao posebnu radnu skupinu čiji je zadatak određivanje novog standarda te preporučuje da zemlje gdje se proizvode tuberkulinski PPD-i uvedu nacionalne i interne (engl. *in-house*) radne standarde kalibrirane prema međunarodnom referentnom standardu (ANONIMNO, 2019c.; DUIGNAN, 2019.).

Tijekom pokusa u obrijanu kožu na leđima zamorčadi ubrizgavaju se najmanje tri serijska razrijeđenja ispitivanog tuberkulinskog PPD-a i paralelno najmanje tri serijska razrijeđenja međunarodnog referentnog standarda. Kako bi se izbjegao utjecaj mjesta primjene na izračun aktivnosti, serijska razrijeđenja istraživanih PPD-a i međunarodnog standarda treba ubrizgavati primjenjujući metodu latinskog kvadrata koja omogućava izlučivanje nekih izvora varijabilnosti. Doze treba odabrati tako da promjer nastalih reakcija bude 8 - 25 mm, a volumeni primijenjenih doza moraju biti postojani, 0,1 mL ili 0,2 mL (ANONIMNO, 2019a.).

Iako se kontrola aktivnosti tuberkulinskih PPD-a iz praktičnih razloga rutinski provodi na zamorčadi, aktivnost određena u njih ne može se direktno primijeniti na goveda, stoga se preporučuje povremeno kontrolirati aktivnost tuberkulinskih PPD-a na govedima oboljelim od

tuberkuloze. Međunarodne referentne standarde obavezno je kontrolirati na govedima (ANONIMNO, 2023c.).

2.1.5.5. Nedostatci tuberkulinskog kožnog testa

Unatoč neosporivoj važnosti u otkrivanju zaraženih jedinki i iskorjenjivanju tuberkuloze goveda, TKT nije idealan dijagnostički postupak. Znatan problem u dijagnostici tuberkuloze ovom metodom predstavljaju lažno pozitivne i lažno negativne reakcije.

Uzrok lažno pozitivnih reakcija najčešće su infekcije s NTM, tj. mikobakterijama koje se nalaze u okolišu. Tuberkulinski PPD-i su složena smjesa proteina, lipida i nukleinskih kiselina koja sadržava mnoštvo antigena zajedničkih različitim vrstama mikobakterija stoga mogu uzrokovati reakciju kasne preosjetljivosti i u životinja senzibiliziranih mikobakterijama koje nisu uzročnici tuberkuloze, a nalaze se u okolišu (MONAGHAN i sur., 1994.; HASLØV i sur., 1995., COONEY i sur., 1997., TAMENI i sur., 1998.). Isto tako, pomoću TKT-a nije moguće razlikovati cijepljene životinje od onih inficiranih, stoga je cijepljenje goveda protiv tuberkuloze zabranjeno u zemljama u kojima se provode programi iskorjenjivanja ove bolesti. Iako je jasno da bi se ovi problemi mogli zaobići detaljnom analizom proteinskog sastava tuberkulinskih PPD-a te identifikacijom mikobakterijskih antigena koji su najsnažniji pokretači kasne preosjetljivosti, što bi u konačnici omogućilo razvoj kvalitetnijih dijagnostičkih testova veće osjetljivosti i specifičnosti, kao i testova pomoću kojih bi bilo moguće razlikovati cijepljene od inficiranih životinja, ovo je u praksi teško provedivo. Zbog načina proizvodnje, tuberkulinski PPD-i sadržavaju proteine u različitim fazama denaturacije što otežava određivanje biološke aktivnosti nekog od njih (PARLANE i BUDDLE, 2015.; MOHAMED, 2017.). Potpunu analizu proteinskog sastava tuberkulinskih PPD-a pokušali su provesti BORSUK i sur. (2009.) metodom tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa, a sposobnost određenih antigena u izazivanju kasne preosjetljivosti određivali su HASLØV i sur. (1995.) te WHELAN i sur. (2010.).

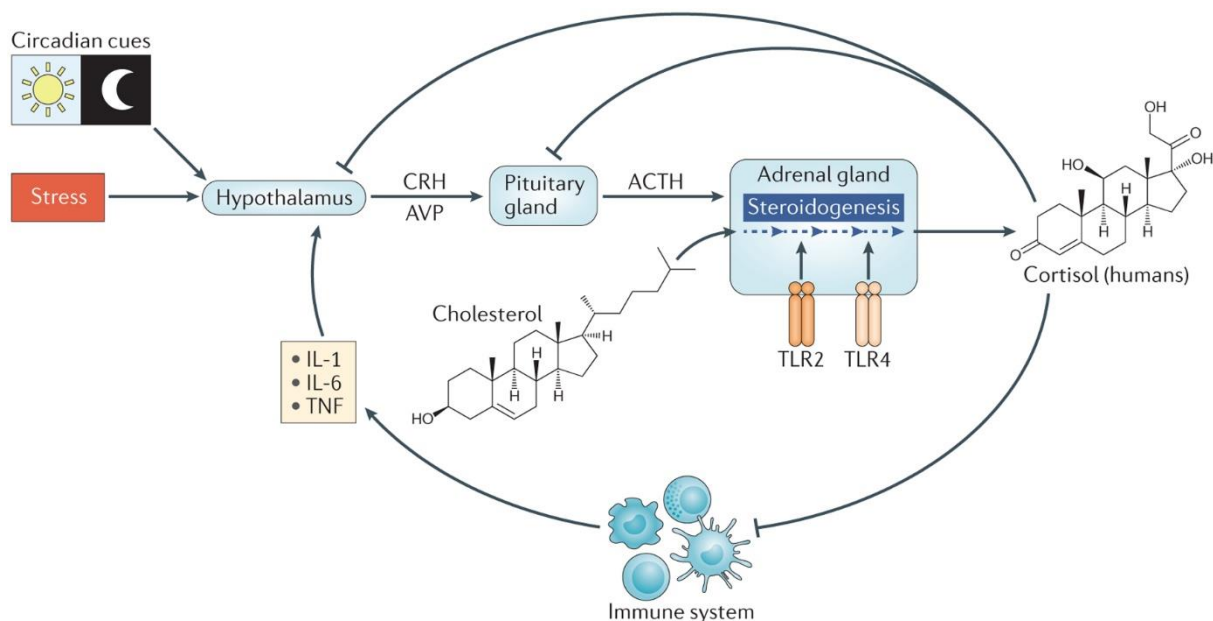
Unatoč navedenom, dijagnostičku vrijednost TKT-a znatno više umanjuju lažno negativni rezultati čiji se uzroci mogu podijeliti na tehničke i biološke (JURČEV-SAVIČEVIĆ i sur., 2013.). U tehničke razloge ubrajaju se niska kvaliteta, nedostatna biološka aktivnost, kontaminacija ili nepravilno skladištenje tuberkulinskih PPD-a, ali također i pogreške prilikom izvođenja testa, poput nepravilne primjene (npr. preduboka aplikacija tuberkulinskog PPD-a) i pogrešnog očitavanja rezultata testa, do kojih najčešće dolazi zbog neodgovarajuće osposobljenosti veterinarima ili osoblja koje provodi test. Biološki uzroci koji mogu dovesti do

lažno negativnih reakcija su mnogobrojni. Do lažno negativnih reakcija mogu dovesti čimbenici vezani uz samog pacijenta i njegov imunosni sustav, poput dobi, imunokomprimitiranosti ili umanjene sposobosti imunosnog sustava pacijenta da ostvari reakciju kasne preosjetljivosti. Lažno negativne reakcije javljaju se i tijekom ranog postporođajnog razdoblja zbog čega se goveda ne preporučuje testirati tijekom prvih 4 - 6 tjedana nakon poroda, kao i u pacijenata u ranom stadiju infekcije, tj. u onih pacijenata u kojih još nije završen proces senzibilizacije. U životinja koje boluju od generalizirane tuberkuloze i u onih s uznapredovalim stadijem bolesti te u životinja izloženih stresu također su česte lažno negativne reakcije. Zbog prolazne desenzibilizacije, tj. smanjene osjetljivosti kože, koja se javlja nakon primjene tuberkulinskog PPD-a, a uzrokovana je promjenom u ravnoteži citokina, TKT se ne smije se ponavljati u intervalima kraćim od 42 dana. Od ostalih bioloških razloga u literaturi se navode terapija glukokortikoidima, pojedine virusne i parazitarne bolesti te anergija kojoj uzrok nije poznat (RADUNZ i LEPPER, 1985.; MONAGHAN i sur., 1994.; POLLOCK i NEILL, 2002.; DE LA RUA-DOMENECH i sur., 2006; COAD i sur., 2010.).

S obzirom na to da se kontrola aktivnosti tuberkulinskih PPD-a provodi na sličan način i temelji na istoj imunosnoj reakciji kao i TKT, sve navedene faktore koji mogu utjecati na učinkovitost TKT-a treba uzeti u obzir i prilikom kontrole aktivnosti tuberkulinskih PPD-a.

2.2. Kortizol

Kortizol pripada skupini hormona steroidne strukture koje izlučuje kora nadbubrežne žlijezde, a koji se zajednički nazivaju kortikosteroidi. Kortikosteroidi su neophodni za održavanje homeostaze te prilagođavanje organizma okolišnim uvjetima, a prema svojim osnovnim biološkim funkcijama dijele se na glukokortikoide, mineralokortikoide i androgene. Osnovna funkcija GK je regulacija metabolizma ugljikohidrata, proteina i masti, međutim oni su nužni i za regulaciju cijelog niza fizioloških procesa poput imunosnog odgovora, rasta kostiju, funkcije krvožilnog sustava, reprodukcije, itd. Mineralokortikoidi održavaju ravnotežu vode i elektrolita, a androgeni, koje nadbubrežna žlijezda izlučuje u vrlo malim količinama, sudjeluju u sintezi drugih spolnih hormona te razvoju i funkcioniranju reproduktivnog sustava. Međutim, ovakva podjela samo je djelomično točna jer GK imaju i ograničeno mineralokortikoidno djelovanje (McKAY i CIDLOWSKI, 2003.; STREHL i sur., 2019.). Kortizol je u zamorčadi, kao i u ljudi, glavni predstavnik GK (KEIGHTLEY i FULLER, 1996.; HAQUE i sur., 2021.), a sintetizira se iz kolesterola u dijelu kore nadbubrežne žlijezde koji se naziva *zona fasciculata* (ARLT i sur., 2005.; THAU i sur., 2021.). Kora nadbubrežne žlijezde ne stvara zalihe kortizola te ga u cirkulaciju ne otpušta kontinuirano. Sinteza i lučenje kortizola u fiziološkim uvjetima pokazuju cirkadijalni ritam usklađen s ciklusom svjetlo-tama pri čemu je u zamorčadi njegova razina u krvi najviša u vrijeme početka faze svjetla, a najniža nekoliko sati prije početka faze tame (GARRIS, 1979.). Sintezu i oslobađanje kortizola u cirkulaciju kontrolira osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (osovina HHN) koja povezuje središnji živčani, endokrini i imunosni sustav, a funkcionira po principu povratne sprege. Nakon aktivacije osovine HHN, vlakna u hipotalamusu počinju oslobađati hormon koji oslobađa kortikotropin (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH). CRH putem hipotalamo-hipofiznog portalnog krvotoka dopire u prednji režanj hipofize, tj. adenohipofizu, gdje stimulira sintezu adrenokortikotropnog hormona (engl. *adrenocorticotrophic hormone*, ACTH) i njegovo oslobađanje u cirkulaciju. Vežući se na specifične receptore u kori nadbubrežne žlijezde ACTH potiče sintezu i oslobađanje kortizola. Povećanje razine kortizola u krvi dovodi do aktiviranja mehanizma negativne povratne sprege što uzrokuje inhibiciju sinteze i oslobađanja CRH i ACTH (WEBSTER i sur., 2002.; RAMAMOORTHY i CIDLOWSKI, 2016.). Osim fizioloških podražaja uzrokovanih izmjenom svjetla i tame, aktivaciju osovine HHN mogu uzrokovati i pojedini citokini te stres (slika 4) (CAIN i CIDLOWSKI, 2017.).



Slika 4. Regulacija sinteze glukokortikoida putem osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda u ljudi (Izvor: CAIN i CIDLOWSKI, 2017.).

U fiziološkim uvjetima najveći dio kortizola krvlju cirkulira vezan za proteine plazme, 80 – 90 % vezano je za globuline koji vežu kortizol, 10 – 15 % za albumine, a samo 5 – 10 % cirkulirajućeg kortizola je slobodno i biološki aktivno (CIZZA i ROTHER, 2012.). Na staničnoj razini bioraspoloživost kortizola reguliraju enzimi 11-beta hidroksisteroid dehidrogenaze, odgovorni za konverziju kortizola u njegov neaktivni oblik kortizon i obrnuto. O aktivnosti i međusobnoj ravnoteži ovih enzima ovisi osjetljivost pojedinog tkiva na kortizol (STREHL i sur., 2019.). Osim u krvi, kortizol se nalazi i u drugim biološkim materijalima, poput sline, mlijeka, mokraće, fecesa i dlake.

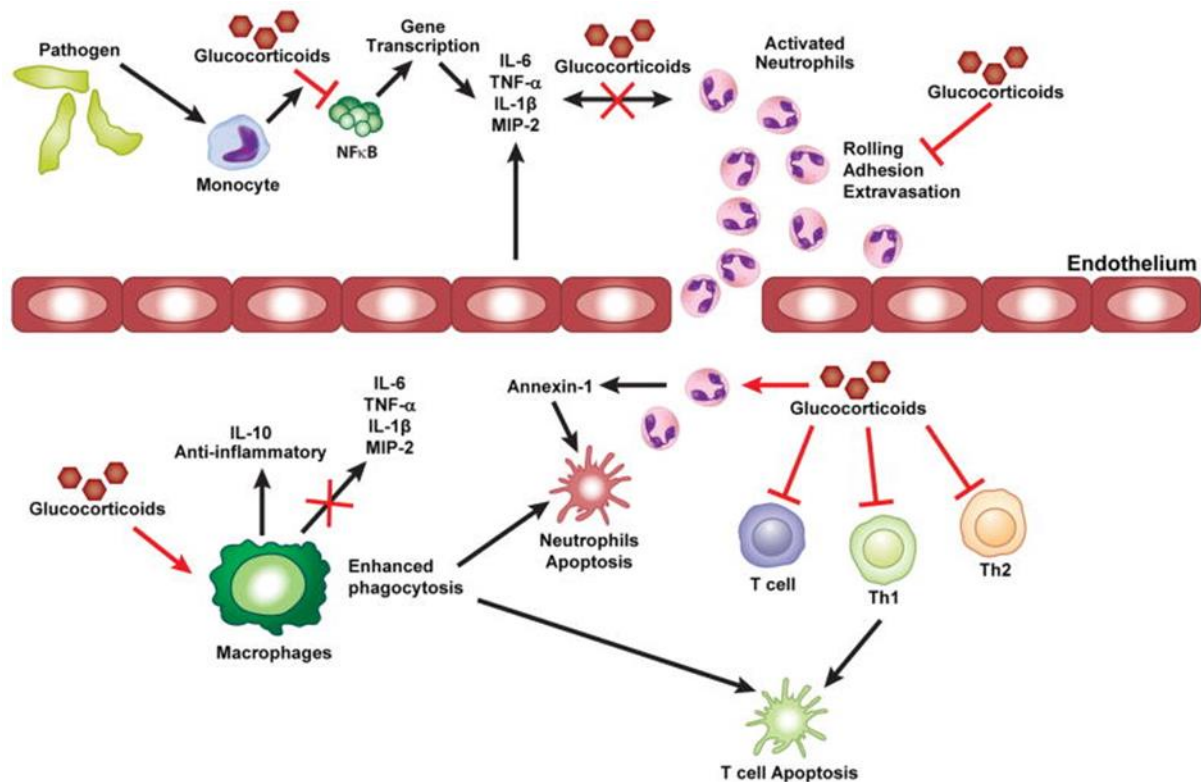
Kortizol, kao i ostali GK, na ciljna tkiva djeluje posredstvom glukokortikoidnih receptora (GR) koji funkcioniraju kao inducibilni transkripcijski faktori aktivirani ligandom, a nalaze se u citoplazmi gotovo svih stanica u organizmu gdje s „pratećim“ proteinima, tj. proteinima toplinskog šoka i imunofilinima, tvore velike proteinske komplekse. S obzirom na to da je zbog svoje građe topljiv u lipidima, kortizol lako difundira kroz stanične membrane te se u citoplazmi veže za GR koji potom prolazi konformacijske promjene. Novostvoreni kompleks kortizol-GR aktivnim se transportom prenosi u jezgru stanice gdje stimulira ili inhibira transkripciju ciljnih gena vežući se na specifične sekvence DNK koje se nazivaju elementi odgovora na glukokortikoide ili na druge transkripcijske faktore (CRUZ-TOPETE i CIDLOWSKI, 2015.). Učinci koje kortizol postiže putem navedenih mehanizama nazivaju se genomske učinci, a većinom se javljaju unutar nekoliko sati nakon aktivacije GR. Međutim, GK

mogu izazvati i brze učinke koji se javljaju unutar nekoliko minuta od aktivacije GR, a s obzirom na to da ovoj vrsti učinaka ne prethodi transkripcija gena, nazivaju se još i negenomskim učincima. Iako mehanizam nastajanja negenomskih učinaka još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da im posreduju receptori spregnuti s membranskim proteinima koji aktiviraju unutarstanične signalizirajuće kaskade ili klasični GR vezani uz membrane (TASKER, 2006.).

2.2.1. Imunoregulacija posredovana glukokortikoidima

Većina steroidnih hormona otkrivena je i izdvojena tijekom 30-ih godina prošlog stoljeća (HILLIER, 2007.). Ubrzo nakon toga postalo je jasno kako GK posjeduju snažno protuupalno i imunosupresivno djelovanje što je dovelo do naglog razvoja njihovih sintetskih analoga te masovne primjene u liječenju mnogobrojnih upalnih, alergijskih i autoimunih bolesti uzrokovanih pretjeranom ili nekontroliranom aktivnošću imunosnog sustava te tijekom postupaka koji zahtijevaju supresiju imunosnog sustava kao što je primjerice transplantacija organa (CAIN i CIDLOWSKI, 2017.). Općenito se smatra da su imunosupresivni, protuupalni i antialergijski učinci GK rezultat privezivanja aktiviranih GR za proupalne transkripcijske faktore poput primjerice nuklearnog faktora kappa B (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NF- κ B) i aktivator proteina 1 (engl. *activator protein*, AP-1). Privezivanjem za transkripcijske faktore GK sprječavaju transkripciju gena koji kodiraju sintezu proupalnih citokina, kemoreaktanata, čimbenika rasta, adhezijskih molekula, imunoreceptora i proteina akutne faze čime ometaju aktivaciju i tijek upalnih procesa (YOSHIKAWA i TASAKA, 2003.). Budući da djeluju na sve vrste imunosnih stanica GK mogu suprimirati imunosni odgovor u bilo kojoj od njegovih faza (slika 5). GK povećavaju broj neutrofila u krvi, međutim, inhibiraju sintezu i oslobađanje posrednika upale i proupalnih citokina, posebice IL-1, IL-6 i TNF- α , iz imunosnih stanica koje prve dolaze u kontakt s uzročnicima upale te ekspresiju adhezijskih molekula na endotelu krvnih žila. Na ovaj način sprječavaju vazodilataciju i povećanje propusnosti krvnih žila čime onemogućavaju, za početnu fazu imunosnog odgovora, karakteristično nakupljanje neutrofila na mjestu upale, kao i stvaranje edema te odlaganje fibrina u tkivo (WEBSTER i sur., 2002.; CAIN i CIDLOWSKI, 2017.). U isto vrijeme, GK smanjuju broj cirkulirajućih monocita i limfocita. Monociti su imunosne stanice koje nakon sazrijevanja u koštanoj srži neko vrijeme cirkuliraju krvlju te potom prelaze u tkiva gdje se pod utjecajem čimbenika rasta razvijaju u makrofage, a obično se na mjestu upale u većem broju pojavljuju nekoliko sati nakon neutrofila. Osim na broj GK

utječu i na fenotip, funkcionalnu sposobnost i životni vijek imunskih stanica. Makrofagi su plastične i vrlo prilagodljive stanice koje ovisno o imunom mikrookolišu tkiva u kojemu se nalaze mijenjaju svoj fenotip i metabolizam. Glukokortikoidi potiču polarizaciju prema protuupalnom fenotipu koji igra važnu ulogu u procesu zacjeljivanja tkiva za razliku od proupalnog fenotipa čija je primarna zadaća fagocitoza i uništavanje patogenih mikroorganizama i stranih čestica te privlačenje drugih imunskih stanica na mjesto upale (DIAZ-JIMENEZ i sur., 2021.). Nadalje, GK stimuliraju pokretljivost i sposobnost fagocitoze, ali i smanjuju funkcionalnu sposobnost fagocita sprječavajući njihovu aktivaciju i „respiratorni prasak“, tj. pojačanu sintezu RKM potrebnu za učinkovito uništavanje uzročnika upale (LIBERMAN i sur., 2018.). Osim navedenog, GK suprimiraju ekspresiju molekula tkivne podudarnosti na površini stanica koje prikazuju antigen (engl. *antigen presenting cells*, APC) čime ometaju proces prikazivanja antigena i koče razvoj specifične imunosti, a posebice razvoj stanične imunosti. Inhibiranjem sinteze i oslobađanja citokina IL-12 iz APC sprječavaju diferencijaciju T-limfocita u Th1-limfocite te usmjeravaju imunski odgovor prema humoralnom odgovoru. To dovodi do smanjenog oslobađanja citokina IFN- γ te posljedično do smanjene aktivacije makrofaga i drugih stanica odgovornih za fagocitozu i uništavanje bakterija i stranih čestica (WEBSTER i sur., 2002.; CAIN i CIDLOWSKI, 2017.; STREHL i sur., 2019.). Osim toga, GK inhibiraju sintezu IL-2 nužnog za proliferaciju T-limfocita te potiču apoptozu, tj. programiranu smrt T-limfocita. Apoptoza je proces razgradnje izdvajanih stanica koji, za razliku od primjerice nekroze, ne uzrokuje oštećenje tkiva i aktivaciju imunskog odgovora te ima važnu ulogu u sprječavanju pretjerane reaktivnosti imunskog sustava i ponovnom uspostavljanju homeostaze (NORTHROP i sur., 1992.; HEROLD i sur., 2006.).



Slika 5. Mehanizmi protuupalnog djelovanja glukokortikoida (Izvor: CRUZ-TOPETE i CIDLOWSKI, 2015.)

Unatoč navedenom, danas se zna da je djelovanje GK pleiotropno, a ne isključivo imunosupresivno i protuupalno. Sve veći broj istraživanja pokazuje kako njihov učinak na imunosni sustav uvelike ovisi o nizu faktora poput podrijetla i vrste GK (endogeni ili egzogeni, prirodni ili sintetski), koncentracije, trajanja izloženosti, fazi imunosnog odgovora, stupnju diferencijacije i aktivacije imunosnih stanica na koje djeluju, ciljnom tkivu te o učinku drugih faktora poput primjerice drugih hormona, neurotransmitera, citokina i slično (SHIMBA i IKUTA, 2020.). Sintetski GK imaju jači afinitet za GR, veću bioraspodjelu te se uslijed slabije razgradnje duže zadržavaju u plazmi od prirodnih GC (COUTINHO i CHAPMAN, 2011.). Dok visoke doze GK, posebice farmakološke doze sintetskih GK, snažno suprimiraju imunosne procese i reakcije, fiziološke razine endogenih GK nužne su za aktivaciju imunosnih stanica te osiguravaju ispravan tijek i funkciju upalnih procesa (AMBROSE, 1970.; STREHL i sur., 2019.). Ipak, o proupalnim učincima GK mnogo se manje zna nego o onim protuupalnim, a mehanizmi njihova nastanka još uvijek nisu pobliže razjašnjeni.

YEAGER i sur. (2011.), kao i BUSILLO i CIDLOWSKI (2013.), smatraju kako GK igraju dvostruku ulogu u regulaciji imunosnog odgovora na upalu ili oštećenje tkiva pri čemu

se njihovi proupalni i protuupalni učinci po potrebi izmjenjuju, a sve u svrhu ponovnog uspostavljanja narušene homeostaze. Prema navedenoj tezi fiziološke razine GK održavaju imunosni sustav u stanju pripravnosti te jačaju urođeni imunosni odgovor dok povećane razine GK uzrokovane aktivacijom osovine HHN uslijed stresa izazvanog upalom ili ozljedom suprimiraju stečenu imunost čime doprinose smirivanju upalnog procesa, sprječavanju oštećenja tkiva na imunosnoj osnovi te ponovnom uspostavljanju homeostaze. Prvom dijelu ove teze u prilog ide činjenica da se broj limfocita u krvi mijenja u skladu s dnevnim oscilacijama u razini GK. U fazi svjetla kada su razine GK u krvi više, T-limfociti se nakupljaju u sekundarnim limfnim tkivima. S obzirom na to da se u tim tkivima odvija prikazivanje antigena i aktivacija T-limfocita imunosni odgovor organizma na infekciju je u ovo vrijeme najučinkovitiji (WAGGONER, 2020.). U skladu s time su i rezultati istraživanja utjecaja stresa na imunosni sustav koji pokazuju da je za vrstu imunomodulacijskog djelovanja GK, uz koncentraciju i trajanje djelovanja, presudno i vrijeme njihovog djelovanja u odnosu na početak imunosnog odgovora, tj. na infekciju ili ozljedu (DHABHAR, 2002.). Stres se definira kao svako stvarno ili očekivano narušavanje homeostaze koje može biti izazvano fizičkim, psihičkim ili socijalnim faktorima, a organizam na njega odgovara aktivacijom simpatičkog živčanog sustava i osovine HHN što dovodi do pojačanog oslobađanja kateholamina i GK (SMITH i VALE, 2006.; ULRICH-LAI i HERMAN, 2009.). Dugotrajna izloženost povećanim razinama GK, kao primjerice kod kroničnog stresa, dovodi do iscrpljivanja organizma i supresije imunosnog sustava. Nasuprot tome, postoji sve više dokaza kako akutni stres ili kratkotrajno povišenje razina GK u određenim uvjetima mogu imati imunostimulirajući učinak. DHABHAR i VISWANATHAN (2005.), VISWANATHAN i sur. (2005.) i SAINT-MEZARD i sur. (2003.) nizom pokusa provedenih na miševima u kojih je izazivana reakcija kasne preosjetljivosti dokazali su kako izlaganje akutnom stresu prije prvog kontakta organizma s antigenom (senzibilizacija) potiče formiranje memorijskih T-limfocita te uzrokuje dugotrajniju imunost i pojačan sekundarni imunosni odgovor pri ponovnom kontaktu s antigenom nekoliko mjeseci kasnije. Na mjestu primarnog kontakta s antigenom u miševa koji su prethodno bili izloženi akutnom stresu zabilježili su izraženiju kliničku sliku upale (oteklina), veći broj leukocita i više razine IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ i TNF- α nego u kontrolnih miševa. Na mjestu sekundarnog kontakta s antigenom zabilježili su znatno više limfocita i makrofaga te više razine IL-2, IFN- γ i TNF- α nego u kontrolnih miševa. Osim toga, DHABHAR i MCEWEN (1996.) dokazali su da i izlaganje akutnom stresu neposredno prije ponovnog kontakta organizma s istim antigenom pojačava sekundarni imunosni odgovor.

2.3. Propolis

Propolis je prirodna smolasta tvar karakterističnog aromatičnog mirisa, a proizvode ga pčele prerađujući tvari koje tijekom ispaše skupljaju s biljaka enzimima iz svoje slin i miješanjem s voskom (ARAUJO i sur., 2012.; DE GROOT, 2013.). Zbog njegovih mehaničkih svojstava i antimikrobnog djelovanja, pčele propolis koriste za oblaganje unutarnjih zidova košnica i zatvaranje pukotina te kao sredstvo za zaštitu košnica od vanjskih nametnika i bolesti. Podatci o primjeni propolisa u narodnoj medicini sežu daleko u prošlost. Poznato je da su ga u vrijeme antike Grci i Rimljani koristili kao sredstvo za zarastanje rana, ispiranje usta te kao antipiretik, dok su ga Egipćani, između ostalog, koristili i za balzamiranje. Propolis se na području Europe, zahvaljujući svom antibakterijskom djelovanju, koristio u razdoblju od 17. do 20. stoljeća toliko često da je u Londonskoj farmakopeji iz 17. stoljeća opisan kao glavni sastojak ljekovitih masti (SFORCIN, 2007.; WAGH, 2013.; HAYRIYE, 2017.). Zabilježeno je i kako se tijekom drugog svjetskog rata u nekoliko Sovjetskih klinika propolis koristio kao jedno od sredstava za pomoć u liječenju tuberkuloze (WAGH, 2013.).

U današnje vrijeme propolis se zbog svojih blagotvornih učinaka na zdravlje intenzivno koristi u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (DE GROOT, 2013.). Također, propolis se sve više koristi i u veterinarskoj medicini (BETANCOURT i sur., 2015.; SANTOS i sur., 2019.; KABAKCI, 2022.). Primjerice, u literaturi je opisana primjena propolisa u liječenju mastitisa goveda i drugih mliječnih preživača (BROZIĆ i sur., 2016.; MACHADO i sur., 2019.), upale uha pasa (LOZINA i sur., 2010.) i dermatofitoze pasa (SANCHEZ i sur., 2014.), ali i primjena propolisa kao dodatka u hrani za različite vrste domaćih životinja (KHOJASTEH SHALMANY I SHIVAZAD, 2006., AGUIAR i sur., 2014., STOLIĆ i sur., 2019.). Propolis ima niz bioloških učinaka, a brojna istraživanja potvrdila su njegove protuupalne (KHAYYAL i sur., 1993.), antibakterijske (GRANGE i DAVEY, 1990.; KUJUMGIEV i sur., 1999.; SCHELLER i sur., 1999.), antioksidativne (KATALINIĆ i sur., 2004.; REIS i sur., 2019.), imunomodulacijske (DRAGANOVA-FILIPOVA i sur., 2014.), antialergijske (NAMBIAR i sur., 2015.; YASAR i sur., 2016.; RI i sur., 2018.), protugljivične (KUJUMGIEV i sur., 1999., OTA i sur., 2001.), antivirusne (SCHNITZLER i sur., 2009.), pa čak i protutumorske učinke (ORŠOLIĆ i sur., 2005.). Propolis je čak i u velikim koncentracijama netoksičan. Prema BURDOCK (1998.) srednja letalna doza za miševe je 2 do 7,3 g/kg t.m. nakon primjene kroz usta, dok su za ljude neškodljive doze i do 1,4 mg/kg t.m./dan. Međutim, propolis posjeduje jak senzibilizirajući učinak te može uzrokovati preosjetljivost. Najčešće se javlja kontaktni dermatitis, i to u profesionalnih pčelara te u ljudi

koji koriste kozmetičke ili farmaceutske proizvode namijenjene za vanjsku primjenu, ali zabilježene su i ozbiljnije sustavne reakcije u tipu anafilaksije (DE GROOT, 2013.).

Propolis je složena smjesa vrlo kompleksnog kemijskog sastava. Približno 50 % sirovog propolisa sačinjavaju biljne smole i balzami, 30 % vosak, 10 % esencijalna ulja, 5 % pelud i 5 % razne organske komponente i minerali. Do danas je u različitim uzorcima propolisa identificirano više od 600 sastavnica, međutim za biološka djelovanja propolisa uglavom su zaslužni polifenoli (AL-HARIRI, 2019.). Polifenoli su molekule biljnog podrijetla koje nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka. Trenutno ih je poznato nešto više od 8000, a na temelju razlika u kemijskoj građi dijele se u nekoliko skupina (PANDEY i RIZVI, 2009.). Kemijski sastav i omjer pojedinih sastavnica propolisa znatno se mijenjaju ovisno o zemljopisnim i klimatskim zonama te vegetaciji područja s kojeg propolis potječe pa je primjerice propolis podrijetlom iz umjerenih klimatskih zona bogat flavonima i flavanonima poput kvercitina, krizina, galangina i pinocembrina te aromatskim kiselinama i njihovim esterima, mediteranski propolis diterpenima, a crveni propolis podrijetlom iz Kube, Brazila i Meksika izoflavonoidima (BOGDANOV, 2016.).

Varijabilnost kemijskog sastava znatno otežava standardizaciju propolisa prema biološkoj aktivnosti i njegovu primjenu u medicinske svrhe, međutim, iako bi bilo za očekivati da propolisi različitog kemijskog sastava posjeduju različita biološka djelovanja, KUJUMGIEV i sur. (1999.) su usporedbom kemijskog sastava i antibakterijskog djelovanja propolisa podrijetlom iz 12 različitih regija svijeta dokazali da se određena biološka djelovanja propolisa ne mogu pripisati pojedinačnim sastavnicama propolisa već sinergijskom djelovanju njegovih komponenti.

Nažalost, za istraživanje bioloških djelovanja, propolis nije moguće koristiti u sirovom obliku. Kako bi se omogućilo djelovanje propolisa, odnosno djelovanje njegovih biološki aktivnih sastavnica, potrebno je provesti njihovu izolaciju ekstrakcijom iz sirovog propolisa. Ekstrakcijom se uklanja netopljivi materijal, a biološki aktivne frakcije ostaju očuvane. U svrhu ekstrakcije najčešće se koriste voda, apsolutni etanol, smjese etanola i vode, glicerol, metanol ili dimetilsulfoksid, a o odabiru otapala znatno ovisi i biološka aktivnost ekstrakta. Naime, različita otapala ekstrahiraju različite biološki aktivne sastavnice propolisa. Iako su vodeni ekstrakti propolisa biološki najkompatibilniji, a njihova primjena sigurna, problem vodenih ekstrakata propolisa je često niska koncentracijska razina njegovih aktivnih sastavnica zbog nepotpune topljivosti u vodi. Stoga je odabir odgovarajućeg ekstrakcijskog postupka i otapala izuzetno važan korak u istraživanjima pojedinih bioloških djelovanja propolisa (PERAK JUNAKOVIĆ, 2023.).

2.3.1. Imunomodulacijsko djelovanje propolisa

Istraživanja pokazuju da imunomodulacijsko djelovanje propolisa ne ovisi samo o njegovom botaničkom podrijetlu, sastavu i načinu ekstrakcije, već i o primijenjenoj koncentraciji, trajanju primjene te sinergiji s drugim tvarima (SFORCIN, 2007.; WOLSKA i sur., 2019.). Prema SCHELLER i sur. (1988.) imunostimulatorni učinak najjači je kada se propolis primjenjuje kratkotrajno. Za stimulaciju ili supresiju imunskog sustava nakon primjene propolisa su, kao i za druge biološke učinke, odgovorni polifenoli. Oni imaju sposobnost da djelovanjem na pojedine enzime i enzimatske sustave te molekularne mehanizme, posebice one uključene u proces aktivacije stanica imunskog sustava, moduliraju složene biološke procese karakteristične za razvoj i tijek imunskih reakcija (JURIKOVA i sur., 2015.). Neki od mehanizama imunomodulacijskog djelovanja propolisa, tj. polifenola koje sadržava, opisanih dalje u tekstu prikazani su na slici 6.

ORSATTI i sur. (2010b) utvrdili su kako kratkotrajna primjena propolisa (200 mg/kg t.m./dan tijekom 3 dana) u miševa dovodi do povećanja ekspresije TLR-2 i TLR-4 receptora peritonealnih makrofaga čime se stimuliraju mehanizmi urođene imunosti te pojačava prva faza imunskog odgovora. Prepoznavanje putem TLR uzrokuje aktivaciju transkripcijskih faktora NF- κ B i AP-1 što dovodi do povećane sinteze proupalnih citokina IL-1 β i IL-6. Nasuprot tome, istraživanje ALANAZI i sur. (2020.) pokazalo je kako propolis (50 μ g/mL) *in vitro* suprimira izlučivanje IL-1 β , IL-6 te u manjoj mjeri TNF- α i smanjuje razine dušikovog oksida, preteče RDM, u makrofagima miševa stimuliranih lipopolisaharidima bakterije *E. coli*.

Propolis može stimulirati mehanizme urođene imunosti pojačavanjem funkcionalne aktivnosti netrofila i makrofaga i povećanjem njihovog kapaciteta fagocitoze (AD'HIAH i sur., 2007) te povećanjem citotoksične aktivnosti NK, koje predstavljaju jednu od komponenti „prve linije obrane“ organizma, a djelovanje im je usmjereno prvenstveno protiv tumora i virusom inficiranih stanica (SFORCIN i sur., 2002.; ORŠOLIĆ i sur., 2005.). Povećana aktivnost makrofaga inducirana trodnevnom primjenom propolisa prije infekcije bakterijama *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ili kvasnicom *Candida albicans* rezultirala je većom stopom preživljavanja inficiranih laboratorijskih miševa, čak i onih kojima je istovremeno s propolisom primijenjena tvar imunosupresivnog djelovanja ciklofosamid (DIMOV i sur., 1991.). Tijekom istog istraživanja ustanovljeno je kako propolis stimulira oslobađanje IL-1 iz makrofaga, međutim nije dokazan utjecaj propolisa na proliferaciju limfocita. Propolis *in vitro* pojačava mikrobicidnu aktivnost makrofaga i protiv unutarstaničnih patogenih mikroba sa sposobnošću preživljavanja u makrofagima kao što je bakterija *Salmonella typhimurium*. Ovaj

učinak, barem djelomično, propolis postiže moduliranjem sinteze RKM i RDM (ORSI i sur., 2005b). Spojevi oksidativnog djelovanja RKM i RDM koji nastaju u aktiviranim makrofagima nužni su za učinkovito ubijanje fagocitiranih patogena. ORSI i sur. (2000.) dokazali su kako propolis, ovisno o koncentraciji, može stimulirati ili suprimirati sintezu RKM u mišjim peritonealnim makrofagima aktiviranim s IFN- γ . Niže koncentracije (2,5 i 5 mg/kg t.m.) uzrokovale su pojačanu sintezu, a više (10, 30 i 60 mg/kg t.m.) smanjenu sintezu RKM. Osim što mogu regulirati sintezu spojeva oksidativnog djelovanja, polifenoli propolisa imaju i snažno antioksidativno djelovanje, tj. uklanjaju slobodne radikale. Slobodni radikali su atomi ili molekule iz skupine RKM i RDM koji u vanjskoj elektronskoj ljusci sadržavaju barem jedan nespareni elektron zbog čega su nestabilni i vrlo reaktivni. Nastaju u organizmu kao produkt normalnih fizioloških procesa, upale, stresa ili pojačanog fizičkog opterećenja, a njihovo stvaranje mogu potaknuti i vanjski utjecaji poput zračenja, dima cigareta, pesticida, onečišćenja zraka, kao i uzimanje pojedinih lijekova. U niskim koncentracijama korisni su i neizostavan dio niza fizioloških procesa, međutim kada se naruši ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i njihovog uklanjanja pomoću antioksidanasa oni počinju uništavati stanične strukture okolnih stanica stupajući u reakcije s molekulama od kojih su one izgrađene poput lipida, proteina, ugljikohidrata i DNK (PHAM-HUY i sur., 2008.). Polifenolne sastavnice propolisa „hvataju“ slobodne elektrone slobodnih radikala te ih na taj način neutraliziraju.

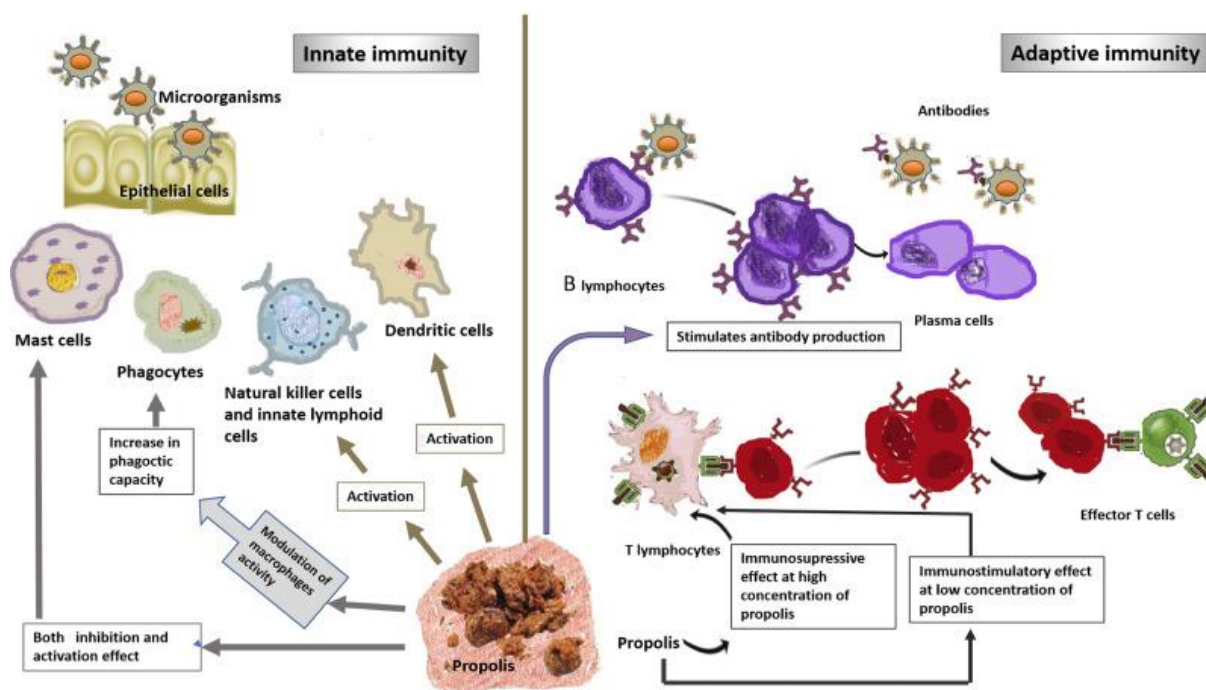
Učinci propolisa i pojedinih njegovih sastavnica istraživani su na različitim modelima akutnih i kroničnih upala, a pokazalo se kako u nekim slučajevima imaju učinak sličan učinku protuupalnih lijekova (ARAUJO i sur., 2012.). Propolis može suprimirati imunosni odgovor inhibicijom NF- κ B, a ovaj učinak posebno je izražen u propolisa koji sadržavaju velike koncentracije fenetil estera kafeinske kiseline (engl. *caffeic acid phenethyl ester*, CAPE) poput onih iz umjerenih klimatskih zona. CAPE može inhibirati i nuklearni faktor aktiviranih T-limfocita što za posljedicu ima smanjenu proliferaciju T-limfocita te smanjeno oslobađanje IL-2 (NATARAJAN i sur., 1996.; MARQUEZ i sur., 2004.). ANSORGE i sur. (2003.) ustanovili su kako propolis te pojedine njegove sastavnice inhibiraju sintezu DNK i proizvodnju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-12, IL-2, IL-4), ali i protuupalnog citokina IL-10, u mitogenom aktiviranim mononuklearnim stanicama i pročišćenim T-limfocitima periferne krvi ljudi *in vitro*. Tijekom sličnog istraživanja, također provedenog *in vitro* na mononuklearnim stanicama periferne krvi ljudi, GIRGIN i sur. (2009.) utvrdili su kako propolis inhibira i proizvodnju citokina IFN- γ i TNF- α . Nasuprot tome, ORSATTI i sur. (2010a) nisu zapazili smanjenu proizvodnju citokina IL-2, IL-4 i IL-10 u konkavalinom A stimuliranim splenocitima miševa kojima je tijekom tri dana primjenjivan propolis, ali su potvrdili smanjenu proizvodnju IFN- γ .

Velik broj objavljenih istraživanja dokazuje kako polifenoli mogu suprimirati razvoj reakcija preosjetljivosti (KAWAI i sur., 2007.; ORŠOLIĆ i BAŠIĆ, 2008.). Međutim, većina ih je provedena na modelima preosjetljivosti tipa I za koje je karakteristična tvorba protutijela, uglavnom onih iz razreda imunoglobulina E (IgE), u fazi senzibilizacije. Tijekom ove vrste reakcija dolazi do degranulacije mastocita i bazofilnih granulocita i oslobađanja velikih količina posrednika upale, poput histamina, ali i citokina TNF- α , IL-1 β , IL-4 i IL-6, koji uzrokuju nakupljanje polimorfonuklearnih leukocita na mjestu reakcije. MIYATAKA i sur. (1998.) su utvrdili kako propolis inhibira oslobađanje histamina iz peritonealnih mastocita štakora, što ovisi o dozi propolisa. Ove rezultate su tijekom sličnog istraživanja provedenog *in vitro* na antigenom stimuliranim stanicama bazofilne leukemije štakora potvrdili NAKAMURA i sur. (2010.), koji su utvrdili kako alkoholni ekstrakti raznih vrsta propolisa snažnije inhibiraju degranulaciju mastocita od vodenih ekstrakata, a navedeni učinak su na temelju daljnjih kromatografskih analiza pripisali flavonoidima krizinu i kaempferolu. U oba istraživanja snažniji učinak su pokazali propolisi koji su sadržavali veću količinu polifenola. Međutim, ORSI i sur. (2005a) su utvrdili da propolis primijenjen u višim koncentracijama (300 $\mu\text{g/mL}$) ima suprotan učinak, tj. da aktivirajući mastocite potiče oslobađanje posrednika upale *in vitro*, čime su dokazali da propolis u manjim koncentracijama suprimira, a u većim koncentracijama potiče razvoj preosjetljivosti.

Antialergijski učinak na reakcije preosjetljivosti tipa I polifenoli postižu: moduliranjem razine unutarstaničnog kalcija u mastocitima čime se smanjuje oslobađanje histamina te smanjenjem ekspresije gena koji kodiraju za proupalne citokine kao što su TNF- α te IL-1 β , IL-4 i IL-6 (BAE i sur., 2011.), inhibiranjem enzima L-histidin dekarboksilaze koji sudjeluje u formiranju histamina i pojedinih molekula koje sudjeluju u kaskadi signalizacije upalne reakcije te supresijom TNF- α i IL-6 (HANIEH i sur., 2017.), supresijom lučenja TNF- α , IL-4 i IL-5 (JUNG i sur., 2008.), inhibicijom oslobađanja histamina, leukotriena, prostaglandina i granulocitno-makrofagnog faktora rasta) (KIMATA i sur., 2000.; WENG i sur., 2012.) ili smanjenjem razine specifičnih IgE protutijela i histamina u plazmi te inhibicijom NF- κB i oslobađanja faktora aktivacije trombocita (PARK i sur., 2008).

DE ALMEIDA (2002.) je proveo opsežno istraživanje u sklopu kojeg je usporedio protuupalni učinak nekoliko različitih ekstrakata propolisa s učinkom protuupalnih tvari, poput acetilsalicilne kiseline i hidrokortizona, na sedam različitih modela pokusno izazvanih upalnih reakcija u miševa, između ostalog i na modelu kasne preosjetljivosti izazvane 2 %-tnim oksazolonom. Oksazolonom je tvar koja se koristi za istraživanje reakcije kasne preosjetljivosti izazvane kemijskim tvarima. Svi istraživani ekstrakti propolisa inhibirali su razvoj reakcije

kasne preosjetljivosti, a obrada dobivenih rezultata pokazala je kako je djelovanje propolisa u 66,7 % slučajeva bilo slično djelovanju hidrokortizona primijenjenog na kožu, a u 11,1 % slučajeva djelovanju nesteroidnih protuupalnih lijekova, ovisno o primijenjenoj dozi. Nasuprot tome, AD'HIAH i sur. (2007.) utvrdili su kako propolis pojačava kasnu preosjetljivost izazvanu primjenom ovčjih eritrocita miševima, čak i u onih miševa čiji je imunski sustav prethodno suprimiran mitomicinom.



Slika 6. Imunomodulacijsko djelovanje propolisa (izvor: ÖZSEZEN i KARAKAYA, 2022.).

Skupina znanstvenika s Instituta za bioznanosti u Sao Paulu u Brazilu provela je niz pokusa na miševima tijekom kojih su istraživani imunomodulacijski učinci propolisa u uvjetima stresa. Tijekom svih pokusa miševima su primjenjivali propolis u dozi 200 mg/kg t.m./dan, a stres su izazivali prisilnim obuzdavanjem kretanja, tijekom 3 dana (akutni stres) ili tijekom 7 ili 14 dana (kronični stres). Utvrdili su kako propolis smanjuje ili sprječava inhibiciju receptora TLR-2 i TLR-4 u splenocitima miševa izazvanu akutnim (PAGLIARONE i sur., 2009a.) ili kroničnim stresom (ORSATTI i SFORCIN, 2012.) čime poboljšava prepoznavanje patogenih mikroba te pojačava fagocitozu i prikazivanje antigena T-limfocitima. Rezultati su pokazali i kako propolis ne sprječava akutnim stresom izazvano smanjeno oslobađanje IFN- γ , međutim sprječava smanjeno oslobađanje protupalnog citokina IL-4 koji stimulira diferencijaciju T-limfocita u Th2-limfocite (PAGLIARONE i sur., 2009b.).

Novija istraživanja ukazuju na to da propolis može, do određene mjere, regulirati izlučivanje GK tijekom izloženosti stresu. Propolis primijenjivan oralno u kombinaciji s medom tijekom 14 dana može dovesti do smanjenog lučenja GK u žena izloženih umjerenoj razini stresa (USMAN i sur., 2020.), dok esencijalno ulje propolisa, također primjenjivano oralno tijekom 14 dana, smanjuje razinu ACTH i kortizola u miševa izloženih stresu prisilnim obuzdavanjem (LI i sur., 2012.). Također, ŠEGVIĆ-BUBIĆ i sur. (2013.) su dokazali kako u brancina u čiju je hranu tijekom 10 tjedana dodavan sirovi propolis dolazi do manjeg lučenja kortizola nakon jednokratnog izlaganja stresu izazvanom niskom temperaturom vode nego u brancina čija hrana prije izlaganja stresu nije sadržavala propolis.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Učinkovitost programa iskorjenjivanja tuberkuloze koji se temelje na ranom otkrivanju goveda inficiranih tuberkuloznim mikobakterijama pomoću TKT-a te njihovom izlučivanju iz stada uvelike ovisi o kvaliteti dijagnostičkog pripravka tuberkulinski PPD. Sposobnost ovog dijagnostičkog pripravka da u senzibiliziranom organizmu izazove reakciju kasne preosjetljivosti odražava njegovu biološku aktivnost i najvažniji je pokazatelj njegove kvalitete. Biološki pokus je trenutno jedini odobreni način kontrole biološke aktivnosti tuberkulinskih PPD-a, a rutinski se provodi na zamorčadi. Tijekom tog pokusa se primjenom tuberkulinskog PPD-a u zamorčica senzibiliziranih vrstom mikobakterije od koje je predmetni tuberkulinski PPD načinjen izaziva kasna preosjetljivost. Kasna preosjetljivost se klinički očituje crvenilom i oteklinom na mjestu primjene tuberkulinskog PPD-a. Biološka aktivnost tuberkulinskih PPD-a određuje se na temelju usporedbe promjera navedenih reakcija nastalih na koži zamorčica na mjestima primjene ispitivanog tuberkulinskog PPD-a s promjerima reakcija nastalih na mjestima primjene međunarodnog standarda tuberkulinskog PPD-a. U laboratorijskih životinja, a posebice u zamorčica koji su po svojoj prirodi vrlo plašljive životinje, ovakvi pokusi mogu izazvati stres za koji je karakteristično pojačano oslobađanje GK, tj. kortizola. Novija istraživanja pokazuju kako akutni stres ili kratkotrajno povišenje razina GK prije senzibilizacije organizma nekim antigenom ili prije ponovljenog kontakta organizma s istim antigenom pojačavaju imunosni odgovor i kasnu preosjetljivost što rezultira povećanjem reakcija koje se javljaju na koži. U današnje vrijeme sve se više istražuje mogućnost primjene određenih prirodnih tvari u prehrani domaćih životinja čija je svrha podizanje opće otpornosti organizma, posebice u uvjetima stresa i izloženosti infekcijama. Istraživanja pokazuju kako propolis, tvar dokazanog imunomodulacijskog djelovanja, može do određene mjere regulirati izlučivanje GK tijekom izloženosti stresu ili umanjiti učinke GK na imunosni sustav. Ovisno o primijenjenoj dozi, propolis može poticati ili kočiti razvoj imunosnih reakcija. Protuupalno djelovanje propolisa dokazano je na raznim modelima akutnih i kroničnih upala u laboratorijskih životinja, između ostaloga i na modelu reakcije kasne preosjetljivosti, te se pokazalo da se u pojedinim slučajevima njegov učinak može usporediti s učinkom protuupalnih lijekova.

S obzirom na sve navedeno, tijekom ovog istraživanja provesti će se pokus na zamorčadi prema prilagođenom protokolu za određivanje biološke aktivnosti bPPD-a opisanom u Ph. Eur. kako bi se utvrdio utjecaj povišenja razina kortizola (kao jednog od faktora stresa) koje prethodi primjeni bPPD-a zamorčicima senzibiliziranim bakterijom *M. bovis* na kliničke znakove kasne preosjetljivosti. Tijekom navedenog pokusa utvrditi će se i utjecaj vodenog ekstrakta propolisa s područja kontinentalne Hrvatske na kliničke znakove kasne preosjetljivosti izazvane bPPD-om u senzibilizirane zamorčadi prethodno izložene kortizolu. Patohistološkim i

imunohistokemijskim analizama uzoraka kože zamorčića u pokusu će se utvrditi razina stanične infiltracije i sastav infiltrata te proizvodnja citokina u koži na mjestima primjene bPPD-a. Reakcije nastale na mjestima primjene bPPD-a biti će snimljene termokamerom kako bi se analizom razlika u temperaturi kože utvrdile razlike u intenzitetu kasne preosjetljivosti izazvane različitim koncentracijama bPPD-a i procijenila mogućnost poboljšanja očitavanja reakcija nastalih na mjestima primjene bPPD-a u senzibiliziranih zamorčića pomoću termokamere.

Spoznaje koje će proizaći iz ovog istraživanja biti će iskoristive u više znanstvenih područja. Rezultati ovog istraživanja dati će nam uvid u biološke mehanizame pomoću kojih kortizol može potaknuti ili suprimirati razvoj stanično posredovanih imunskih odgovora. Rasvjetljavanje ovih mehanizama pridonijeti će boljem razumijevanju složenih interakcija imunskog i endokrinološkog sustava. Nadalje, rezultati ovog istraživanja proširiti će trenutne spoznaje o potencijalnim primjenama propolisa podrijetlom iz kontinentalnog dijela Hrvatske, ali i dati uvid u mogućnost primjene termokamera u kontroli aktivnosti tuberkulinskih PPD-a.

Hipoteza ovog istraživanja:

Kortizol primijenjen zamorčićima senzibiliziranim bakterijom *M. bovis* prije primjene bPPD-a pojačati će intenzitet imunskog odgovora u smislu pojačane infiltracije imunskih stanica karakterističnih za kasnu preosjetljivost na mjestima primjene bPPD-a te dovesti do povećanja promjera reakcija na koži zamorčića. Nadalje, primjena propolisa će umanjiti učinak kortizola na intenzitet imunskog odgovora i staničnu infiltraciju na mjestu primjene bPPD-a te na taj način spriječiti povećanje promjera reakcija na koži uzrokovano kortizolom.

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- istražiti učinak kortizola primijenjenog zamorčićima senzibiliziranim bakterijom *M. bovis* prije primjene bPPD-a na kliničke znakove kasne preosjetljivosti, tj. na promjer reakcija koje se javljaju na koži na mjestima primjene bPPD-a
- istražiti utjecaj vodenog ekstrakta propolisa s područja kontinentalne Hrvatske na kliničke znakove kasne preosjetljivosti izazvane bPPD-om u senzibilizirane zamorčadi prethodno izložene kortizolu
- patohistološkim i imunohistokemijskim analizama uzoraka kože utvrditi razinu stanične infiltracije i sastav infiltrata te proizvodnju citokina u koži zamorčadi u pokusu na mjestima primjene bPPD-a
- analizom termografskih snimki utvrditi razlike u temperaturi kože zamorčadi na mjestima primjene različitih koncentracija bPPD-a te procijeniti mogućnost poboljšanja

očitanja reakcija nastalih na mjestima primjene bPPD-a u senzibiliziranih zamorčića
pomoću termokamere

4. MATERIЈAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Životinje u pokusu

U svrhu ovog istraživanja proveden je pokus na 30 muških zamorčića soja Hartley (Charles Rivers Laboratories, Saint Germain Nuelles, Francuska) slobodnih od specifičnih patogena i tjelesne mase 285 – 340 g. Prilikom prijema u nastambu za laboratorijske životinje Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI) registriranu pri Ministarstvu poljoprivrede i šumarstva zamorčići su klinički pregledani i slučajnim odabirom podijeljeni u četiri skupine, jednu skupinu sa šest životinja (kontrolna skupina, K) i tri skupine sa po osam životinja (pokusne skupine, P1 - P3). Zamorčići su držani u uvjetima sukladnim onim propisanim u Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine (NN) 55/13, NN 39/17, NN 116/19) i Zakonu o zaštiti životinja (NN 102/17, NN 32/19), po jedan u kavezu opremljenom hranilicom i pojilicom. Svim zamorčićima je tijekom pokusa bio omogućen neograničen pristup certificiranoj standardnoj komercijalnoj hrani za zamorčad (Dieta Standard 8GP17, Complete feed for guinea pigs, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i pitkoj vodi s dodatkom 0,5 g vitamina C/L (Sallant, Myristica d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska). Uz hranu i vodu zamorčićima je svakodnevno ponuđeno sijeno (Versele-Laga, Deinze, Belgija) i 40 g svježeg voća i povrća.

Uvjeti u nastambi bili su prilagođeni zamorčadi u pokusu (ciklus 12 sati svjetlo/12 sati tama, temperatura 22 ± 2 °C, relativna vlaga 55 ± 10 %) i svakodnevno kontrolirani, kao i zdravstveni status zamorčića. Tjelesna masa zamorčića mjerena je jednom tjedno pomoću digitalne vage Beurer KS25 (Beurer GmbH, Ulm, Njemačka).

4.1.2. Inaktivirana kultura bakterije *Mycobacterium bovis* za senzibilizaciju zamorčića

4.1.2.1. Hranjiva podloga Stonebrink

Hranjiva podloga Stonebrink potrebna za uzgoj bakterije *M. bovis* pripremljena je u Laboratoriju za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju HVI-a na način opisan u nastavku.

U odmjernu tikvicu odvagano je 2,50 g natrijevog piruvata (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i 1,00 g kalijevog dihidrogenfosfata (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), a potom je u tikvicu uz miješanje dodano 150 mL destilirane vode. Nakon što su se kemikalije u

potpunosti otopile, a otopina postala bistra u tikvicu je polagano dodavan natrijev hidrogenfosfat (približno 0,70 g) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) do postizanja pH 6,5. U drugoj odmjernoj tikvici otopljeno je 0,05 g boje kristal violet (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska) i 0,40 g boje malahitno zelenilo (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska) u 50 mL destilirane vode. Otopina dobivena miješanjem otopina pripremljenih u prvoj i drugoj tikvici sterilizirana je autoklaviranjem pri 121 °C tijekom 20 minuta i potom ohlađena na sobnu temperaturu. Za to vrijeme je u tikvici sa zncima miješanjem homogenizirano 12 – 14 svježih jaja (žumanjci i bjelanjci). Jaja su prije uporabe dobro očišćena i dezinficirana. Homogenizirana mješavina svježih jaja (400 mL) pomiješana je s ohlađenom autoklaviranom otopinom. Na ovaj način pripremljena hranjiva podloga razlivena je u sterilne bočice (5 mL/bočica) s čepom (Deltalab, Rubi, Španjolska). Bočice su nakon punjenja postavljene u inspikator (BARI d.o.o., Velika Gorica, Republika Hrvatska) u kosi položaj te su hranjive podloge zgusnute dehidracijom pri 85 °C tijekom 40 minuta. Gotove hranjive podloge pohranjene su u hladnjak (2 - 8 °C) do uporabe.

4.1.2.2. Inaktivirana kultura bakterije *Mycobacterim bovis*

Suspenzija inaktivirane kulture bakterije *M. bovis* namijenjena za senzibilizaciju životinja u pokusu pripremljena je u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti HVI-a. Za pripremu suspenzije korišten je soj *M. bovis* izoliran 2011. godine iz organa goveda oboljelog od tuberkuloze u Sisačko-moslavačkoj županiji i pohranjen u kriobanku pri - 80 °C. Navedeni soj prethodno je korišten za senzibilizaciju zamorčića tijekom rutinske kontrole aktivnosti serija bPPD-a namijenjenih za hrvatsko tržište zbog njegovog provjerenog senzibilizirajućeg učinka, odnosno poticanja odgovarajuće imunosne reakcije.

Bakterijski izolat naciepljen je na Stonebrink hranjive podloge pripremljene na način opisan u prethodnom odjeljku. Nakon šest tjedana inkubacije pri 37 °C s podloga su pokupljene dvije bakteriološke ušice izraslih kolonija i razmućene u 150 µL fiziološke otopine u mikroepruveti volumena 2 mL s čepom na navoj (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). U mikroperuvetu je potom pomoću pipete dodano još 350 µL fiziološke otopine. Bakterije u ovako pripremljenoj suspenziji inaktivirane su autoklaviranjem pri 121 °C tijekom 20 minuta.

4.1.3. Propolis

Sirovi propolis prikupljen je iz košnica na području općine Bizovac u Osječko-baranjskoj županiji te u čvrsto zatvorenoj plastičnoj vrećici pohranjen u hladnjak na 2 – 8 °C do daljnje obrade. Vodeni ekstrakt propolisa je tijekom pokusa pripreman jednom tjedno na način opisan u YILDRIM i sur. (2014.). U staklenu čašu odvagano je 50 g usitnjenog uzorka sirovog propolisa, na to je dodano 150 mL destilirane vode te je smjesa stavljena na magnetsku miješalicu Assistant TMA 2071 (Karl Hecht GmbH, Sondheim, Njemačka) tijekom 48 sati, u mraku, pri sobnoj temperaturi. Nakon 48 sati miješanja, smjesa je profiltrirana kroz filter papir Whatman No. 4 (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Ujedinjeno Kraljevstvo) te djelomično uparena pod vakuumom na rotacijskom uparivaču (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka) pri temperaturi 60 °C. Upareni vodeni ekstrakt propolisa (7,5 g) nadopunjen je destiliranom vodom do 100 mL u odmjerne tikvici i pohranjen pri 2 - 8 °C do primjene.

4.1.4. Kortizol

U pokusu je korišten komercijalni medicinski proizvod SOLU-CORTEF 100 mg prašak i otapalo za otopinu za injekciju/infuziju (Pfizer Limited, Havant, Ujedinjeno Kraljevstvo). Jedna bočica ovog medicinskog proizvoda sadržava 100 mg hidrokortizona u obliku natrijevog hidrokortizonsukcinata. Prašak je otopljen u pripadajućem otapalu prema uputama proizvođača neposredno prije primjene zamorčicima.

4.1.5. Otopine međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata

4.1.5.1. Otopina fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80

Otopina fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80 pripremljena je u Laboratoriju za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju HVI-a. U odmjernu tikvicu volumena 1000 mL odvagano je 2,38 g natrijevog hidrogenfosfat dodekahidrata (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska), 0,19 g kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska) i 8,00 g natrijevog klorida (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska). Tikvica je potom nadopunjena ultračistom destiliranom vodom do oznake 1000 mL, sadržaj u njoj dobro je promiješan, a

nakon potpunog otapanja kemikalija u sredinu otopine je pomoću mikropipete dodano 0,005 g polisorbata 80 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Njemačka). Na ovaj način pripremljena otopina sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta.

4.1.5.2. Međunarodni standard bovinog pročišćenog proteinskog derivata

U pokusu je korišten međunarodni standard bPPD-a (Purified Protein Derivative of *M. bovis* Tuberculin, WHO 1st International Standard, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, Engleska). Jedna ampula s 1,8 g liofiliziranog standarda sadržava 58500 i.j. bPPD-a. Standard je do primjene u pokusu čuvan u zamrzivaču pri -20 °C u skladu s uputama proizvođača. Za potrebe pokusa su, na način opisan u nastavku teksta, pripremljena tri serijska razrijeđenja, tj. tri otopine standarda s različitim sadržajem PPD-a po mL (A - 500 i.j. PPD-a/mL, B - 125 i.j. PPD-a/mL i C - 31,25 i.j. PPD-a/ mL).

Početna otopina (32500 i.j. bPPD-a/mL) dobivena je otapanjem sadržaja jedne ampule standarda u 1,8 mL otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80. Jedan mL početne otopine pomiješan je sa 5,5 mL otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80. Na ovaj način dobivena je otopina koja sadržava 5000 i.j. bPPD-a/mL. Kako bi se dobila otopina A (500 i.j. bPPD-a/mL) 1 mL ove otopine pomiješan je s 9 mL otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80. Otopina B koja sadržava 125 i.j. bPPD-a/mL pripremljena je miješanjem 2 mL otopine A i 7 mL otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80, a otopina C koja sadržava 31,25 i.j. bPPD-a/mL miješanjem 1 mL otopine B i 4 mL otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80.

Tijekom pripreme svih otopina opisanih u ovom odjeljku korišten je sterilni laboratorijski pribor. Svaka otopina pripremljena je u drugoj sterilnoj čaši volumena 10 mL, a za prebacivanje sadržaja iz jedne u drugu čašu i dodavanje otopine fosfatnog pufera s NaCl i polisorbatom 80 korištene su sterilne igle i štrcaljke.

4.1.6. Anestetici i analgetici

Za anesteziju i analgeziju zamorčića prije eutanazije korišteni su komercijalni veterinarsko-medicinski proizvodi odobreni za stavljanje u promet u Republici Hrvatskoj Ketastamin 100 mg/mL, otopina za injekciju (Produlab Pharma B.V., SJ Raansdonksveer,

Nizozemska) i Sedachem, 20 mg/mL, otopina za injekciju (Interchemie Werken De Adelaar Eesti AS, Püünsi, Estonija).

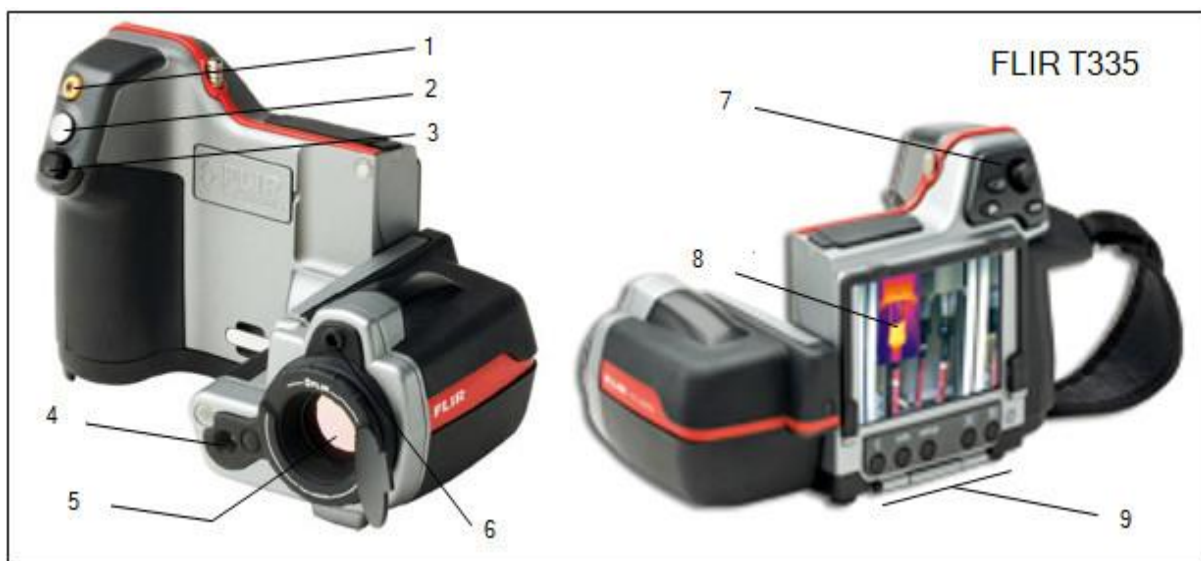
Ketastamin 100 mg/mL, otopina za injekciju u jednom mL sadržava 100 mg djelatne tvari ketamin, a Sedachem, 20 mg/mL, otopina za injekciju 20 mg djelatne tvari ksilazin.

4.1.7. Termografski sustav za primjenu u medicini (ThermoMED IRB-ZEL)

Termografski sustav za beskontaktno mjerenje temperature sastoji se od infracrvene (IR) termografske kamere T335 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, SAD) i pripadajućeg računala s odgovarajućom programskom podrškom za obradu i vizualizaciju podataka prikupljenih u postupku snimanja (mjerenja).

Termografska kamera T335 (Slika 7) sadržava matrični, nehlađeni mikro-bolometrijski senzor za prihvrat IR slike od objekta snimanja. Senzor posjeduje prostornu razlučivost od 320 x 240 točaka (pixel), ukupno 76800 točaka po slici, visoke temperaturne osjetljivosti (engl. *Noise Equivalent Temperature Difference*, NETD) od $\geq 0,05^{\circ}$ K. Osim IR spektra snimanja (Slika 7, poz. 5) (8,5 - 13 μ m), kamera T335 ima i mogućnost snimanja vidljivog spektra pomoću kamere u boji sa sklopom s prijenosom naboja (engl. *charge-coupled device*, CCD) (Slika 7, poz. 4) u rezoluciji 3,1 Mpix s crvenim laserskim pokazivačem (Slika 7, poz. 1, 6). Mjerno područje snimanja moguće je izabrati unutar vrijednosti od -20 do 120 $^{\circ}$ C, odnosno od 100 do 560 $^{\circ}$ C. Kamera ima standardni objektiv od 25 $^{\circ}$ (prostorna rezolucija 1,36 mrad), s mogućnošću njegove izmjene, najmanja udaljenost je 0,4 m (fokus), a najveći broj slika u sekundi (engl. *frame rate*) 10. Kamerom se upravlja pomoću ručnih komanda (Slika 7 poz. 1, 2, 3, 7) i ekrana od tekućih kristala (engl. *Liquid Crystal Display*, LCD) (Slika 7, poz. 8) osjetljivog na dodir. Kamera omogućuje žičano (Slika 7, poz. 9) (engl. *Universal Serial Bus* 3,0, USB3) povezivanje sa računalom, na kojem je pomoću odgovarajuće programske podrške (FLIR QuickPlot ver.1.2) omogućeno upravljanje, snimanje i obrada IR slika. Kamera ima memoriju 4 Gb za arhiviranje IR (radiometrijski .jpg format) i vidljivih (.jpg format) slika. Također, kamera može preko „Bluetooth“ veze primati podatke od vanjskih instrumenata (vlagomjera i/ili mjerača temperature zraka okoline, tzv. „MeterLink“ veza) radi korekcije rezultata u postupku mjerenja.

Dodatnu analizu termalnih snimaka moguće je obaviti pomoću programskog paketa ThermoMED razvijenog na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Ovaj programski paket omogućuje čitav niz opcija analize, poput primjerice lineranog i 3D prikaza temperaturne raspodjele unutar proizvoljno odabranog područja, histograma, itd.



Slika 7. Termografska kamera FLIR T335. (1) komandni gumb za crveni laserski pokazivač; (1, 2, 3, 7) upravljački sustav; (4) kamera u boji sa sklopom s prijenosom naboja; (5) snimanje IR spektra; (6) crveni laserski pokazivač; (8) ekran od tekućih kristala osjetljiv na dodir; (9) žičano povezivanje s računalom (Izvor: dr. sc. Darko Kolarić, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Republika Hrvatska)

4.2. Plan istraživanja

4.2.1. Pokus

Pokus je započeo nakon 30 dana prilagodbe zamorčića na nove uvjete držanja odnosno vremena u kojem su svi zamorčići postigli tjelesnu masu potrebnu za sudjelovanje u pokusu (400 - 600 g). Pokus je proveden sukladno Zakonu o zaštiti životinja (NN 102/17, NN 32/19), usklađenom s europskim propisima, i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13, NN 39/17, NN 116/19), a odobrili su ga Etičko povjerenstvo HVI-a (BROJ: Z-VI-4-1468-1/19. od 03. 04. 2019.), Povjerenstvo za dobrobit životinja HVI-a (BROJ: ZVI-4-1662/19. od 16. 04. 2019.), Etičko povjerenstvo za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe Ministarstva poljoprivrede (KLASA: UP/I-322-01/19-01/37, UR. BROJ: 525-10/0543-19-5, 25. listopada 2019. godine; KLASA: UP/I-322-01/20-01/29, UR. BROJ: 525-10/0543-20-2, 21. srpnja 2020. godine) i Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta (KLASA: 640-01/20-17/07, UR. BROJ: 251-61-44-20-02, 20. veljače 2020. godine).

Prema klasifikaciji Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13, NN 39/17, NN 116/19) ovaj se pokus smatra blagim pokusom, a tijekom njegove

provedbe zamorčići nisu bili izlagani boli, tjeskobi ili patnji. Sve metode primjene ispitivanih tvari zamorčićima, kao i metode uzimanja uzoraka te metode mjerenja i snimanja kožnih reakcija na bPPD koje su se provodile za vrijeme života zamorčića smatraju se neinvazivnim metodama. Uzorci krvi i kože uzimani su nakon eutanazije zamorčića.

Pokus je proveden prema prilagođenom protokolu za određivanje aktivnosti bPPD-a opisanom u Ph. Eur. monografiji 01/2008:0536. Broj zamorčića u pokusnim skupinama odabran je prema broju zamorčića potrebnih za određivanje aktivnosti bPPD-a preporučenom u navedenoj monografiji, a broj zamorčića u kontrolnoj skupini je najmanji broj potreban za statističku obradu dobivenih podataka. Plan pokusa prikazan je u tablici 3. U svrhu dobivanja što točnijih rezultata u pokusu se vodila briga i o točnom vremenu provođenja aktivnosti na zamorčićima.

Na dan 0 pokusa, u 8 sati, svim zamorčićima iz pokusnih skupina (P1 – P3), u svrhu senzibilizacije, u medijalnu stranu mišića desnog buta pomoću sterilne igle (Becton, Dickinson & Co. Ltd., Drogheda, Irska) i štrcaljke (CHIRANA T. Injecta, Stara Tura, Slovačka) aplicirana je suspenzija inaktivirane kulture bakterije *M. bovis*. Zamorčićima iz skupine P3 je svakodnevno, u 9 sati i 30 minuta, počevši na 0-ti dan pokusa pa sve do zadnjeg dana pokusa, peroralno, uz pomoć pipete, primjenjivan vodeni ekstrakt propolisa. Nakon perioda potrebnog da se razvije imunosni odgovor, tj. šest tjedana nakon senzibilizacije, 42. dana pokusa, zamorčićima svih skupina su obrijana leđa na obje strane tijela koristeći pribor za šišanje i brijanje dlake. Na 43. dan pokusa, u 8 sati, zamorčićima iz skupina P2 i P3 je jednokratno intramuskularno apliciran kortizol. Tri sata nakon primjene kortizola, u 11 sati, zamorčićima iz sve četiri skupine su sterilnom iglom i štrcaljkom za tuberkulinizaciju (CHIRANA T. Injecta, Stara Tura, Slovačka) u kožu na obrijanoj površini leđa primijenjene otopine međunarodnog standarda bPPD-a (Slika 8). Dvadeset i četiri sata nakon primjene bPPD-a, tj. 44. dana pokusa u 11 sati, zamorčići su podvrgnuti termografskom snimanju. Odmah potom izmjeren je promjer reakcija nastalih na mjestima primjene bPPD-a nakon čega su zamorčićima primijenjeni anestetici i analgetici te su u prijenosnim kavezima premješteni u sekcionu dvoranu Laboratorija za patologiju HVI-a gdje su eutanazirani cervikalnom dislokacijom.

Tablica 3. Plan pokusa

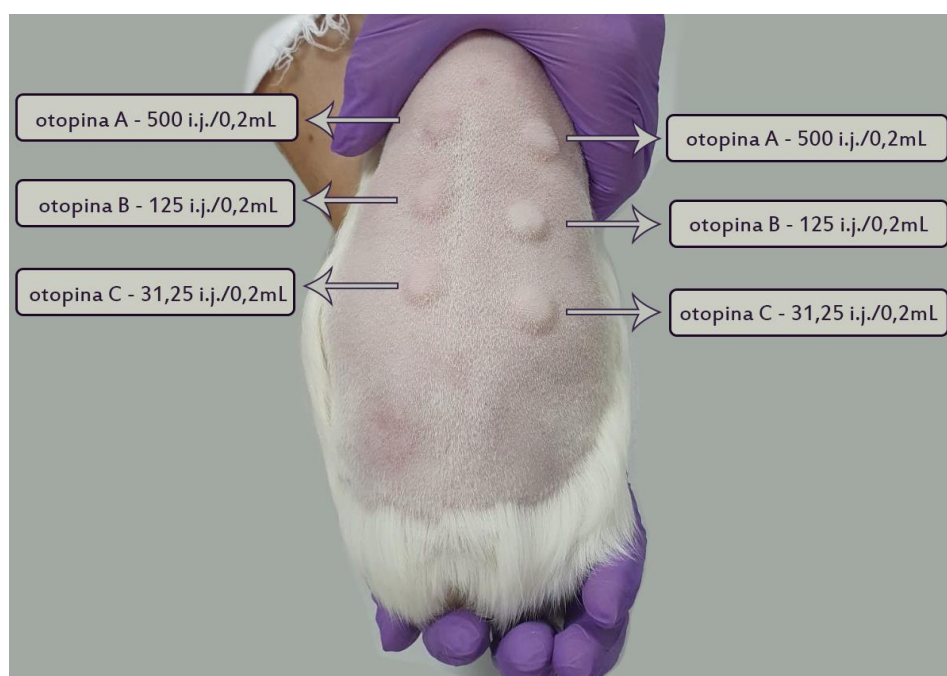
Dan pokusa	Vrijeme dana	Postupak	Skupina			
			K	P1	P2	P3
0	08:00 h	Senzibilizacija*		x	x	x
0 - 44	09:30 h	Propolis**				x
43	08:00 h	Kortizol***			x	x
43	11:00 h	bPPD****	x	x	x	x

* 0,5 mL suspenzije inaktivirane kulture bakterije *M. bovis*/životinji

** 1,2 g vodenog ekstrakta propolisa/kg t.m.

*** 100 mg hidrokortizona/kg t.m.

**** 3 otopine (A - 500 i.j. bPPD-a/mL; B – 125 i.j. bPPD-a/mL; C - 31,25 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bPPD-a (otopina A – 2 x 0,2 mL/životinji; otopina B – 2 x 0,2 mL/životinji; otopina C – 2 x 0,2 mL/životinji)



Slika 8. Shema primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a u kožu na leđima zamorčica
(Izvor: vlastita fotografija)

4.2.2. Uzorci

4.2.2.1. Slina

Uzorci sline uzimani su 0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 43. i 44. dan pokusa. Uzorci su uvijek uzimani u isto vrijeme (9 sati i 30 minuta) kako bi se izbjegao utjecaj dnevnih fluktuacija kortizola na rezultate. Uzorci sline su 43. dana pokusa, osim u 9 sati i 30 minuta, uzeti još tri puta (neposredno prije primjene kortizola, 3 sata nakon primjene kortizola, tj. neposredno prije primjene bPPD-a i 90 minuta nakon primjene bPPD-a).

Uzorci sline uzimani su prema prilagođenom protokolu opisanom u NEMETH i sur. (2016). Najviše dva zamorčića odjednom izvađena su iz kaveza i stavljena na suprotne strane stola tako da se međusobno ne vide. Nakon što su se umirili, zamorčićima je u usta, između lijevih prekutnjaka i kutnjaka i obraza umetnut plastični štapić s pamučnim vrhom (Lola Ribar d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska). Zamorčićima je dozvoljeno da štapiće žvaču, ali uz oprez da ih ne pregrizu. Štapići su iz usta zamorčića izvađeni nakon 1 minutu te stavljeni u mikroepruvete zapremnine 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u koje su prethodno postavljeni plastični nastavci za pipete od 1 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) s odrezanim vrhom. Slina je iz štapića ekstrahirana centrifugiranjem (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 14000 okretaja/min tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja, iz mikroepruveta su odstranjeni nastavci za pipete i štapići, a uzorci sline su pohranjeni pri -20 °C do daljnje obrade.

4.2.2.2. Krv

Neposredno nakon eutanazije, od svake životinje su uzeta 2 uzorka krvi punkcijom iz srca. Uzorak za hematološku pretragu uzet je u sterilnu epruvetu volumena 3 mL (Vacuette Tube, K₃EDTA, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija) s antikoagulansom, a uzorak za biokemijsku pretragu u sterilnu epruvetu s gelom volumena 3,5 mL (Vacuette Tube, CAT Serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija).

4.2.2.3. Koža

Uzorci kože leđa s mjesta na koja je primijenjen bPPD, kao i uzorci nepromijenjene kože za kontrolu, uzeti su pomoću jednokratnih „punch“ instrumenata za biopsiju promjera 4 mm (KAI group, Tokyo, Japan). Na ovaj način dobiveni su uzorci u obliku cilindra koji sadržavaju presjek svih slojeva kože. Svaki uzorak je stavljen u jednu prethodno označenu kazeticu za čuvanje i fiksaciju uzoraka (Deltalab, Rubi, Španjolska) i odmah potom uronjen u bočicu s 10 %-tnim neutralnim formalinom.

4.3. Metode

4.3.1. Termografsko snimanje

Prije početka snimanja termografska kamera (vidjeti odjeljak 4.1.7.) montirana je na fotografski tronožac te pomoću USB kabla spojena s računalom. U računalu su nakon pokretanja programa uvršteni podatci o temperaturi prostorije u kojoj se provodilo snimanje, postotak vlage, udaljenost s koje će zamorčići biti snimani, temperatura refleksije IR zračenja od objekata u prostoru te koeficijent emisivnosti ϵ objekta. Temperatura prostorije za vrijeme snimanja bila je kontrolirana i stabilna te nije oscilirala više od 1 °C. Zamorčići su snimani jedan po jedan, prije početka snimanja svaki zamorčić je stavljen na čvrstu hladnu podlogu (klupu) ispod fotografskog tronošca s kamerom i pušten da se umiri. Snimanja svih životinja obavljena su u istoj prostoriji, a obavila ih je ista osoba pomoću jedne kamere.

4.3.2. Očitavanje reakcija na primjenu međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata

Životinje su, jedna po jedna, postavljene na čvrstu podlogu (stol) pod dobrim osvjetljenjem te puštene da se umire. Promjeri reakcija nastalih na koži na mjestima na koje je primijenjen bPPD, izmjereni su umjerenim digitalnim pomičnim mjerilom Cd-15cpx (Mitutoyo Corporation, Kawasaki-shi, Japan), u dva poprečna smjera i izraženi u milimetrima (slika 9). Kako bi se izbjegla pogreška, sva mjerenja obavila je ista osoba. Rubovi navedenih reakcija su nakon mjerenja označeni kako bi se olakšalo uzimanje uzorka kože.



Slika 9. Očitavanje reakcija kasne preosjetljivosti na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a (Izvor: vlastite fotografije)

4.3.3. Određivanje razina kortizola u uzorcima sline

Uzorci sline, pripremljeni na način opisan u odjeljku 4.2.2.1., izvađeni su iz zamrzivača, zagrijani na sobnu temperaturu te nakon kratkog miješanja na mješalici Assistant Reamix 2789 (Karl Hecht GmbH, Sondheim, Njemačka) centrifugirani (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 14000 okretaja/min tijekom 15 minuta.

Razina kortizola u ovako pripremljenim uzorcima sline određena je pomoću komercijalnog kompetitivnog imunoenzimnog kompleta Salivary Cortisol ELISA Kit (Salimetrics, State College, Pennsylvania, SAD) slijedeći upute proizvođača. Ovaj komplet sadržava mikrotitarsku pločicu s 96 jažica presvučenih protutijelima za kortizol, jedan red jažica koje nisu presvučene protutijelima za kortizol te sve reagense i standardne otopine potrebne za određivanje razina kortizola osim deionizirane vode potrebne za razrjeđivanje priloženog koncentriranog pufera za ispiranje. Prije provođenja testa, svi priloženi materijali, reagensi i standardne otopine zagrijani su na sobnu temperaturu, koncentrirana otopina pufera za ispiranje razrijeđena je deioniziranom vodom u omjeru 1:9 (V:V), a jažice mikrotitarske pločice na pozicijama H1 i H2 zamijenjene su jažicama koje nisu obložene protutijelima za kortizol.

U dvanaest jažica mikrotitarske pločice pipetom su odmjereni standardi (svaki standard u dvije jažice, 25 μ L po jažici), u četiri jažice odmjerene su kontrolne otopine (svaka kontrolna otopina u dvije jažice, 25 μ L po jažici), a u četiri jažice (dvije obložene protutijelima za kortizol i dvije koje nisu obložene protutijelima za kortizol) odmjereno je po 25 μ L pufera za razrjeđivanje. U potreban broj preostalih jažica iste mikrotitarske pločice pipetom je odmjereno

po 25 μL pojedinog uzorka sline. Nakon toga, u svaku jažicu dodano je 200 μL enzim konjugata (kortizol obilježen peroksidazom iz hrena) koji je neposredno prije toga razrijeđen u puferu za razrjeđivanje u omjeru 1:1600 (V:V). Uslijedilo je miješanje na tresilici (Tehtnica Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija) tijekom 5 minuta pri 500 okretaja/min i inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom jedan sat. Tijekom inkubacije kortizol iz istraživanih uzoraka natječe se s kortizolom obilježenim peroksidazom za slobodna vezna mjesta na mikrotitarskoj pločici. Nakon postizanja reakcijske ravnoteže, jažice na pločici su četiri puta isprane razrijeđenim puferom za ispiranje (4 x 300 μL). Ispiranjem su iz jažica uklonjena nevezana protutijela. Mikrotitarska pločica je nakon ispiranja prislonjena na apsorbirajuću podlogu kako bi se iz jažica uklonio suvišak pufera za ispiranje. Nakon što je u sve jažice pomoću multikanalne pipete dodano po 200 μL supstrata, pločica je postavljena na tresilicu (5 minuta, 500 okretaja/min). Potom je uslijedila inkubacija tijekom 25 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 μL stop otopine u svaku jažicu te je uslijedilo miješanje na tresilici (500 okretaja/min) sve dok sadržaj svih jažica nije promijenio boju u žuto (najmanje 3 minute). Intenzitet boje, odnosno optička gustoća, očitana je pomoću čitača mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija) pri valnoj duljini od 450 nm.

Slijedeći upute proizvođača iz dobivenih vrijednosti optičke gustoće izračunati su postotci vezanja svakog pojedinog standarda, kontrole i uzroka. Pomoću računalnog programa GraphPad Prism 9 je na temelju koncentracija šest standarda priloženih u testu te za njih određenih postotaka vezanja izrađena standardna krivulja preko koje su interpolacijom određene razine kortizola u uzorcima sline. Uzorci u kojima je utvrđena razina kortizola veća od 30 ng/mL razrijeđeni su u puferu za razrjeđivanje i ponovno testirani na gore opisani način. Dobivene koncentracije kortizola očitane iz standardne krivulje pomnožene su s faktorom razrjeđenja kako bi se dobila stvarna razina kortizola u slini.

4.3.4. Određivanje razina kortizola u uzorcima krvi

Razina kortizola određivana je u uzorcima seruma pripremljenima za biokemijsku pretragu na način opisan u odjeljku 4.3.7. pomoću komercijalnog kompetitivnog imunoenzimnog kompleta Cortisol Parameter Assay Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, SAD) slijedeći upute proizvođača. Ovaj komplet također sadržava sav materijal potreban za određivanje razina kortizola osim deionizirane vode. Nakon što se sav materijal iz kompleta zagrijao na sobnu temperaturu, a prije provođenja testa, pripremljeno je 500 mL razrijeđenog pufera za ispiranje (20 mL koncentrirana otopina pufera za ispiranje + 480 mL

deionizirane vode). Nakon toga je rekonstitucijom liofiliziranog standarda u deioniziranoj vodi pripremljena temeljna standardna otopina koncentracije 100 ng/mL. Nakon 15 minuta, bočica sa temeljnom otopinom je blago protresena te je pomoću diluenta (Calibrator Diluent RD5-43) u posebnoj epruveti pripremljena otopina standarda koncentracije 10 ng/mL (900 µL diluenta + 100 µL temeljne otopine standarda) iz koje su potom pripremljena dvostruka serijska razrijeđenja (5 ng/mL do 0,156 ng/mL) otopine standarda. Kako bi se iz uzoraka seruma uklonili proteini koji bi mogli utjecati na rezultate testa te kortizol vezan za proteine, 200 µL svakog uzorka je u posebnoj mikroeproveti pomiješano s 200 µL prvog reagensa za pripremu uzoraka (Pretreatment E). Nakon inkubacije tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi, ovako pripremljeni uzorci su centrifugirani (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 14000 okretaja/min tijekom 4 minute. Iz svake mikroeprove je potom u posebnu mikroeprovetu pomoću pipete preneseno 200 µL supernatanta te na to dodano 100 µL drugog reagensa za pripremu uzoraka (Pretreatment F). Po 20 µL svakog od na ovaj način pripremljenih uzoraka razrijeđeno je s 380 µL diluenta Calibrator Diluent RDS-43 u posebnoj mikroeproveti.

U prve dvije jažice prvog reda mikrotitarske pločice pipetom je odmjereno 150 µL, a u prve dvije jažice drugog reda 100 µL pufera za razrjeđivanje. U preostale jažice pipetom su odmjerene otopine standarda ili uzorci sline (svaka otopina standarda ili uzorak u dvije jažice, 100 µL po jažici). U jažice je potom dodano po 50 µL enzim konjugata (kortizol obilježen peroksidazom iz hrena, crvena boja i konzervansi). Nakon što je sadržaj u jažicama promijenio boju u crveno, pipetom je u sve njih, osim u prve dvije jažice prvog reda mikrotitarske pločice, odmjereno po 50 µL otopine primarnog protutijela nakon čega je sadržaj svih jažica u koje je protutijelo dodano promijenio boju u ljubičasto. Mikrotitarska pločica je zatim prekrivena zaštitnom folijom te je uslijedila inkubacija tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi uz stalno miješanje na tresilici (Tehtnica Železniku d.o.o., Železniki, Slovenija) na 500 ± 50 okretaja/min. Pred sam kraj inkubacije pripremljen je supstrat miješanjem dvije boje priložene u kitu (Colour Reagent A i Colour Reagent B). Nakon inkubacije je pomoću pipete odstranjen sadržaj iz jažica, a jažice su potom 4 puta isprane razrijeđenim puferom za ispiranje (4 x 400 µL) kako bi se iz njih uklonila nevezana protutijela. Mikrotitarska pločica je nakon ispiranja prslonjena na apsorbirajuću podlogu kako bi se iz jažica uklonio suvišak pufera za ispiranje. U suhe jažice je pomoću multikanalne pipete dodano po 200 µL pripremljenog supstrata te je uslijedila inkubacija tijekom 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 µL stop otopine u svaku jažicu, a sadržaj u njima potom je promijenio boju iz

plave u žutu. Optička gustoća očitana je pomoću čitača mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija) pri valnoj duljini od 450 nm.

Slijedeći upute proizvođača iz dobivenih vrijednosti optičke gustoće izračunati su postotci vezanja svakog pojedinog standarda, kontrole i uzroka. Pomoću računalnog programa GraphPad Prism 9 je na temelju koncentracija standarda te za njih određenih postotaka vezanja izrađena standardna krivulja preko koje su interpolacijom određene razine kortizola u uzorcima seruma. Dobivene razine kortizola očitane iz standardne krivulje pomnožene su s faktorom razrjeđenja kako bi se dobila stvarna razina kortizola u serumu.

4.3.5. Hematološka pretraga

Uzorci krvi iz epruveta s antikoagulansom K3-EDTA analizirani su neposredno nakon uzimanja pomoću automatskog hematološkog analizatora VetScan[®] HM5 (Abaxis Inc., Union City, Kalifornija, SAD). Rezultati analize leukocita i trombocita izraženi su kao broj stanica u litri krvi ($\times 10^9/L$), a rezultati analize limfocita, monocita i neutrofila kao broj stanica u litri krvi ($\times 10^9/L$), i kao postotak od ukupnog broja leukocita (%). Rezultati analize eritrocita također su izraženi kao broj stanica u krvi ($\times 10^{12}/L$). Rezultati analize razine hemoglobina u krvi i prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC) izraženi su u jedinici mase (gramima) po decilitru. Rezultati analize hematokrita i trombokrita izraženi su u postotcima, rezultati prosječnog volumena eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*, MCV) i prosječnog volumena trombocita (engl. *Mean Platelet Volume*, MPV) u jedinici volumena (femtolitrama, 10^{-15} L), a rezultati prosječne količine hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH) u jedinici mase (pikogramima). Rezultati koeficijenta varijacije raspodjele eritrocita po volumenu (engl. *Red Cell Distribution Width Coefficient of Variation*, RDWC) i rezultati koeficijenta varijacije raspodjele trombocita po volumenu (engl. *Platelet Distribution Width Coefficient of Variation*, PDWC) izraženi su u postotcima, a rezultati standardne devijacije raspodjele eritrocita po volumenu (engl. *Red Cell Distribution Width Standard Deviation*, RDWS) i rezultati koeficijenta varijacije raspodjele trombocita po volumenu (engl. *Platelet Distribution Width Standard Deviation*, PDWS) u jedinici volumena (femtolitrama, 10^{-15} L).

4.3.6. Određivanje serumskih biokemijskih pokazatelja

Uzorci krvi namijenjeni za biokemijsku pretragu su odmah nakon uzimanja centrifugirani (Benchtop ROTINA 420, Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchleugern, Njemačka) na 14000 okretaja/min tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, serum je odvojen u plastične mikroepruvete volumena 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te odmah potom upotrijebljen za određivanje vrijednosti biokemijskih pokazatelja. Vrijednosti serumskih biokemijskih pokazatelja alanin aminotransferaze (engl. *alanine aminotransferase*, ALT), albumina, alkalne fosfataze (engl. *alkaline phosphatase*, ALP), amilaze, ukupnog kalcija, kreatinina, globulina, glukoze, fosfora, kalija, natrija, ukupnog bilirubina, ukupnih proteina i urea nitrata određene su na biokemijskom analizatoru VetScan VS2 (Abaxis, Inc., Union City, Kalifornija, SAD) pomoću VetScan® Comprehensive Diagnostic Profile diskova (Abaxis, Inc., Union City, Kalifornija, SAD) slijedeći upute proizvođača.

4.3.7. Patohistološka pretraga

Izrada histoloških preparata provedena je u Laboratoriju za transmisivne spongiformne encefalopatije HVI-a. Uzorci kože (vidjeti odjeljak 4.2.2.4.) su nakon 24 sata fiksacije u 10 %-tnom neutralnom puferiranom formalinu isprani u tekućoj vodi te pomoću automatiziranog tkivnog procesora Microm stp-120 (Thermo Scientific, Walldorf, Njemačka) dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (75 %, 96 % i 100 %) i bistreni u reagensu Neo-Clear (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Potom je uslijedilo uklapanje uzoraka u parafin pomoću stanice za uklapanje u parafin Microm EC 350-1 (Thermo Scientific, Walldorf, Njemačka). Iz parafinskih blokova su pomoću mikrotoma Hyrax S50 (Carl Zeiss, Gottingen, Njemačka) načinjeni rezovi debljine 5 µm te postavljeni na predmetna stakalca StarFrost (Waldemar Knittel, Braunschweig, Njemačka). Preparati su zatim obojani hematoksilin-eozin metodom te poklopljeni pokrovnim stakalcima Eurotubo (Deltalab, Rubi, Španjolska). Patohistološka analiza ovako pripremljenih uzoraka obavljena je pomoću svjetlosnog mikroskopa Axio Imager.A2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, White Plains, SAD) pri povećanjima 10x, 20x i 40x.

4.3.8. Imunohistokemijska pretraga

Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože provedeno je u Laboratoriju za transmisivne spongiformne encefalopatije HVI-a. Uzorci kože pretraženi su na prisutnost pomoćničkih T-limfocita (kunićja poliklonska protutijela za CD4, Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD), citotoksičnih T-limfocita (mišje monoklonsko protutijelo za CD8, Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD), makrofaga (kuniće rekombinantno monoklonsko protutijelo za CD68, Bio-technie, Minneapolis, Minnesota, SAD) te citokina IL-1 (mišje monoklonsko protutijelo za IL-1, Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD), IL-6 (kunićja poliklonska protutijela za IL-6, Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD), TNF- α (mišje monoklonsko protutijelo za TNF- α , Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD) i IFN- γ (kuniće monoklonsko protutijelo za IFN- γ , Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD) (tablica 4.). Za imunohistokemijsku pretragu korišteni su parafinski blokovi prethodno napravljeni za patohistološku pretragu.

Iz parafinskih blokova su pomoću mikrotoma Hyrax S50 (Carl Zeiss, Gottingen, Njemačka) načinjeni rezovi debljine 3 μ m te postavljeni na predmetna stakalaca (FLEX IHC microscope slides, Dako Denmark A/S, Golstrup, Danska). Rezovi su poravnati na vodenoj kupelji Leica HI1210 (Leica Biosystems, Wetzlar, Njemačka) zagrijanoj na 40 °C te potom osušeni u termostatu pri 37 °C tijekom 24 sata. Nakon sušenja rezovi su deparafinizirani u reagensu Neo Clear (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i potom rehidrirani u etanolu padajuće koncentracije (100 %, 96 %, 75 %) i destiliranoj vodi. Otkrivanje antigena provedeno je u mikrovalnoj pećnici tijekom 20 minuta pri 800 W u Tris/EDTA puferu pH 6,0 (Target Retrieval Solution, Dako Denmark A/S, Golstrup, Danska) nakon čega su stakalca s rezovima ohlađena do sobne temperature tijekom 20 - 30 minuta i potom uronjena u pufer za ispiranje (Dako Denmark A/S, Golstrup, Danska) na 20 minuta. U međuvremenu su pomoću diluenta (Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako Denmark A/S, Golstrup, Danska) pripremljena potrebna razrijeđenja primarnih protutijela (tablica 4.). Svi sljedeći koraci provedeni su u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi koristeći reagense priložene u komercijalnom kitu EnVision FLEX, High pH (Dako Denmark A/S, Golstrup, Danska). Stakalca s rezovima su na samom početku postupka isprana u puferu za ispiranje, a potom je uslijedilo je blokiranje aktivnosti endogene peroksidaze u tkivu pomoću fosfatnog pufera koji sadržava vodikov peroksid, natrijev azid i deterdžent tijekom 5 minuta nakon čega su stakalca opet isprana puferom za ispiranje. Rezovi su potom inkubirani u protutijelu (tablica 4.) i isprani puferom za ispiranje. Uslijedila je inkubacija u konjugatu (dekstran povezan s

peroksidazom i kozjim protutijelom za mišje i kuniće imunoglobuline tijekom 20 minuta) te potom dva ispiranja u puferu za ispiranje i na kraju uranjanje stakalaca u pufer za ispiranje tijekom 5 minuta. Na rezove je potom nanijet koromogen supstrat koji imunoreakciju prikazuje kao tamno smeđe obojenje. Nakon 10 minuta stakalca su ponovno isprana u puferu za ispiranje te je na rezove nanijet hematoksilin i ostavljen da djeluje tijekom najviše 1 minutu. Stakalca su potom isprana prvo u tekućoj vodi, zatim tijekom 5 minuta u puferu za ispiranje te na kraju u destiliranoj vodi. Nakon ispiranja, rezovi su dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (75 %, 96 %, 100 %) i bistreni u reagensu Neo-Clear te pokriveni ljepilom (Mounting Medium, Thermo Scientific, Walldorf, Njemačka) i pokrovnim stakalcem Eurotubo (Deltalab, Rubi, Španjolska). Pregled na ovaj način pripremljenih tkivnih rezova obavljen je pomoću svjetlosnog mikroskopa Axio Imager.A2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, White Plains, SAD) pri povećanjima 10x, 20x i 40x.

Tablica 4. Popis komercijalnih protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi tkivnih rezova

Protutijelo	Domaćin, izotip	Kataloški broj	Razrjeđenje	Vrijeme inkubacije	Proizvođač
kunića poliklonska protutijela za CD4	IgG	NBP1-19371	1:200	30 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD
mišje monoklonsko protutijelo za CD8	IgG1	NBP100-64021	1:30	60 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD
kuniće rekombinantno monoklonsko protutijelo za CD68	IgG klon #2449D	MAB101 141	1:100	60 minuta	Bio-technie, Minneapolis, Minnesota, SAD
mišje monoklonsko protutijelo za IL-1	IgG1 Kappa	NBP2-80793	1:200	30 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD
kunića poliklonska protutijela za IL-6	IgG	NB600-1131SS	1:500	90 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD
mišje monoklonsko protutijelo za TNF- α	IgG1	NB600-1422	1:50	60 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD
kuniće monoklonsko protutijelo za IFN- γ	IgG	NBP2-66900	1:75	60 minuta	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, SAD

4.4. Statistička obrada rezultata

Određene vrijednosti kvantitativnih varijabli (tjelesna masa, prirast, promjeri reakcija nastalih na koži zamorčića na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a, hematološki pokazatelji, biokemijski pokazatelji, razina kortizola u slini, razina kortizola u krvi) analizirane su pomoću statističkog računalnog programa Stata 13.1 (StataCorp LLC, College Station, Texas, SAD).

Na samome je početku napravljena deskriptivna analiza svih navedenih varijabli. Pravilnost razdiobe određenih vrijednosti svake varijable provjerena je Shapiro-Wilk testom, a homogenost varijance Levenovim testom. Kod varijabli čije su vrijednosti ispunjavale uvjete pravilne razdiobe za provjeru da li postoji statistički značajna razlika između grupa provedena je analiza varijance (ANOVA). U slučaju kada vrijednosti pojedine varijable nisu ispunjavale uvjete pravilne razdiobe podatci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. U slučaju da se pokazalo kako ima razlika između skupina kao *post-hoc* test je korišten Tukey test. Razlike u proporcijama (udjeli pojedinih subpopulacija leukocita u ukupnom broju leukocita) testirane su Hi kvadrat testom.

Rezultati statističke usporedbe izraženi su pomoću p vrijednosti, a statistički značajnim su smatrane p vrijednosti manje od 0,05 ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

5.1. Zdravstveni nadzor životinja u pokusu

Prilikom prijema u nastambu za laboratorijske životinje HVI-a kliničkim pregledom je utvrđeno kako su svi zamorčići odgovarajuće kondicije i dobrog zdravstvenog stanja. Tijekom razdoblja prilagodbe i za vrijeme trajanja pokusa niti u jednog zamorčića nisu primijećeni simptomi odstupanja od fiziološkog stanja, promjene ponašanja ili klinički znakovi bolesti. Svi zamorčići pokazivali su interes za hranom i vodom primjeren vrsti i dobi. Feces i mokraća bili su normalnog izgleda.

Niti u jednog senzibiliziranog zamorčića (skupine P1, P2, P3), kao niti u jednog zamorčića kojemu je primijenjen kortizol (skupine P2 i P3) nisu primijećene lokalne reakcije na mjestu primjene inaktivirane kulture bakterije *M. bovis*, odnosno na mjestu primjene kortizola. Niti u jednog zamorčića iz skupine P3 nisu primijećene neželjene reakcije na propolis.

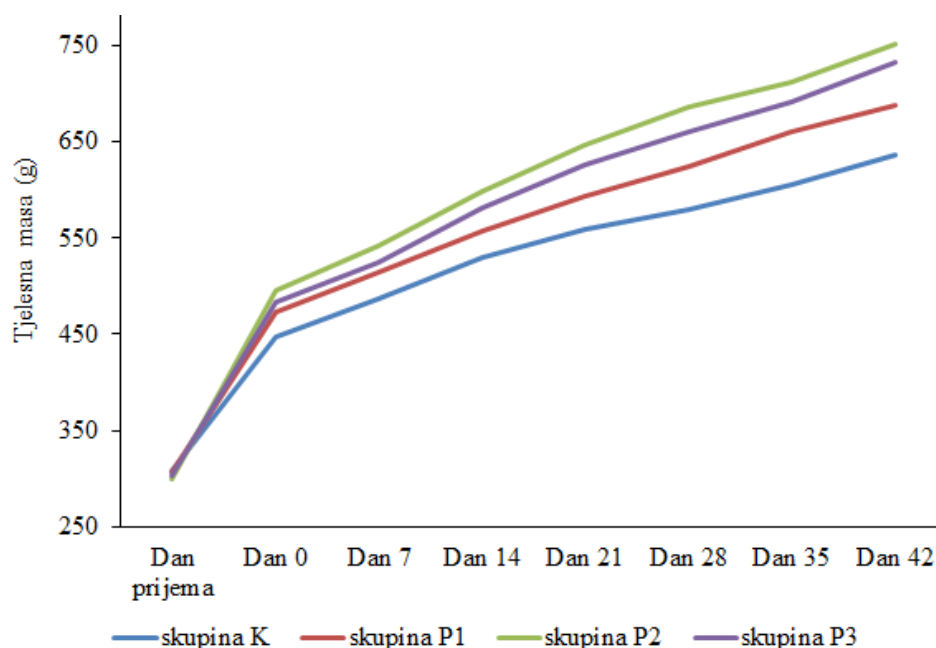
5.2. Promjene tjelesne mase životinja tijekom pokusa

Srednje vrijednosti tjelesne mase zamorčića na dan prijema te na dane 0, 7, 14, 21, 28, 35 i 42 prikazane su u tablici 5, a dinamika dobivanja zamorčića na tjelesnoj masi tijekom pokusa na slici 10. Na dan prijema, kada su zamorčići nasumičnim odabirom podijeljeni u skupine, srednja vrijednost tjelesne mase nije se razlikovala između skupina, međutim na dan 0 pokusa srednja vrijednost tjelesne mase zamorčića iz skupine P2 bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od srednje vrijednosti tjelesne mase zamorčića iz skupine K, a ovakav odnos tjelesnih masa zabilježen je i na sve sljedeće dane mjerenja tijekom pokusa.

Tablica 5. Tjelesne mase zamorčića na određene dane pokusa izražene u gramima i prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija srednje vrijednosti

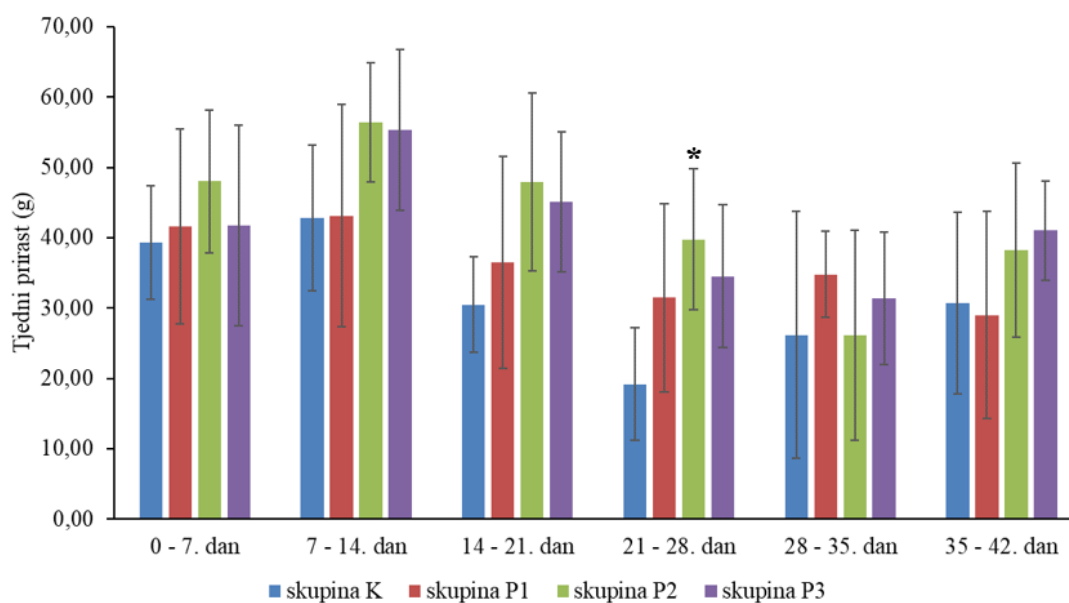
Dan pokusa	Skupina			
	K	P1	P2	P3
Dan prijema	307,83 $\pm$ 18,39	306,00 $\pm$ 16,67	299,63 $\pm$ 12,27	303,50 $\pm$ 10,11
Dan 0	447,17 $\pm$ 23,94	472,50 $\pm$ 29,88	494,75 $\pm$ 30,75*	483,63 $\pm$ 23,22
Dan 7	486,50 $\pm$ 25,97	514,13 $\pm$ 41,87	542,75 $\pm$ 37,63*	525,38 $\pm$ 34,05
Dan 14	529,33 $\pm$ 31,44	557,25 $\pm$ 56,67	599,13 $\pm$ 43,84*	580,75 $\pm$ 41,49
Dan 21	559,83 $\pm$ 36,82	593,75 $\pm$ 69,56	647,00 $\pm$ 52,79*	625,88 $\pm$ 47,37
Dan 28	579,00 $\pm$ 39,06	625,25 $\pm$ 81,23	686,75 $\pm$ 56,54*	660,38 $\pm$ 51,72
Dan 35	605,17 $\pm$ 47,26	660,00 $\pm$ 86,09	712,88 $\pm$ 63,52*	691,75 $\pm$ 57,50
Dan 42	635,83 $\pm$ 51,53	689,00 $\pm$ 98,87	751,13 $\pm$ 62,75*	732,75 $\pm$ 54,91

* - statistički značajno veća srednja vrijednost tjelesne mase ($p < 0,05$) u odnosu na srednju vrijednost tjelesne mase zamorčića iz skupine K



Slika 10. Dinamika dobivanja zamorčića na tjelesnoj masi tijekom pokusa

Tjedni prirasti se tijekom pokusa nisu statistički značajno razlikovali između pojedinih skupina zamorčića, osim u razdoblju od 21. do 28. dana pokusa kada je tjedni prirast zamorčića iz skupine P2 bio statistički značajno veći od tjednog prirasta zamorčića iz skupine K (slika 11).

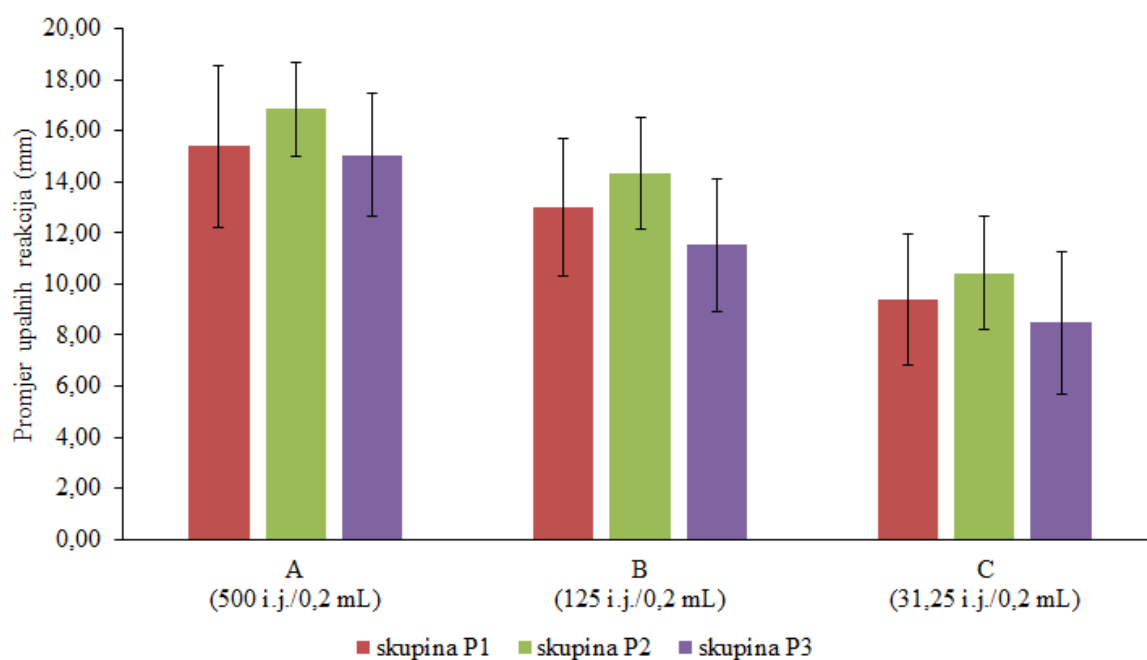


Slika 11. Tjedni prirasti zamorčića tijekom pokusa

* - statistički značajno veći prirast ($p < 0,05$) u odnosu na prirast skupine K

5.3. Rezultati očitavanja reakcija na primjenu međunarodnog standarda bovinog pročišćenog proteinskog derivata

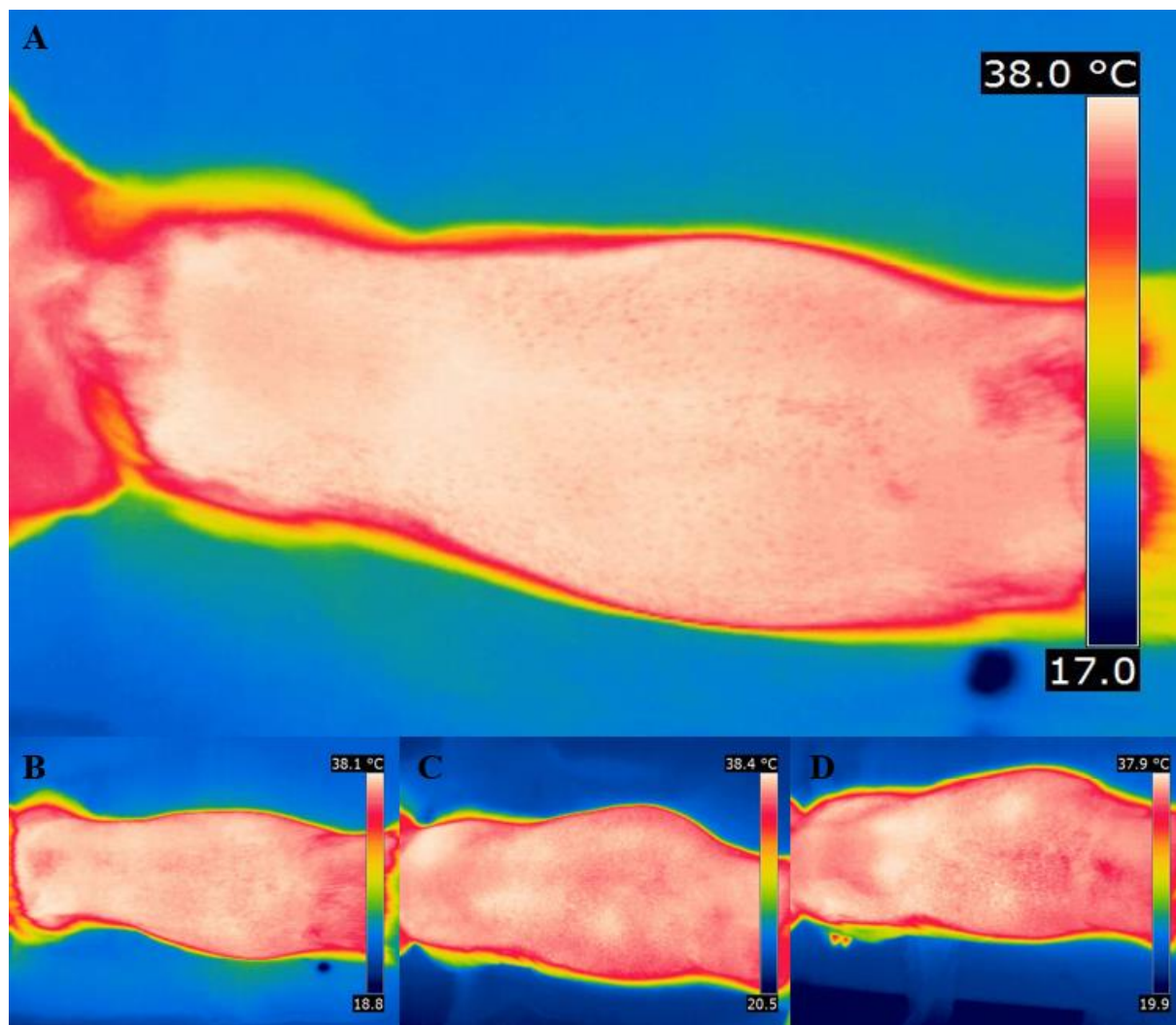
Dvadeset i četiri sata nakon primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a niti u jednog nesenzibiliziranog zamorčića (kontrolna skupina) nisu zabilježene reakcije na mjestima primjene. Rezultati mjerenja promjera reakcija nastalih na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a u preostale tri skupine, tj. u senzibiliziranih zamorčića, izraženi u milimetrima prikazani su na slici 12.



Slika 12. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti promjera reakcija (mm) nastalih na mjestima primjene otopina A, B i C međunarodnog standarda bPPD-a u senzibiliziranih zamorčića

5.4. Termografsko snimanje

Analiza termografskih snimki leđa zamorčića snimljenih 24 sata nakon primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a pokazala je da u niti jednog zamorčića nema razlike između temperatura površine kože na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a i temperature netretiranih dijelova kože (slika 13).

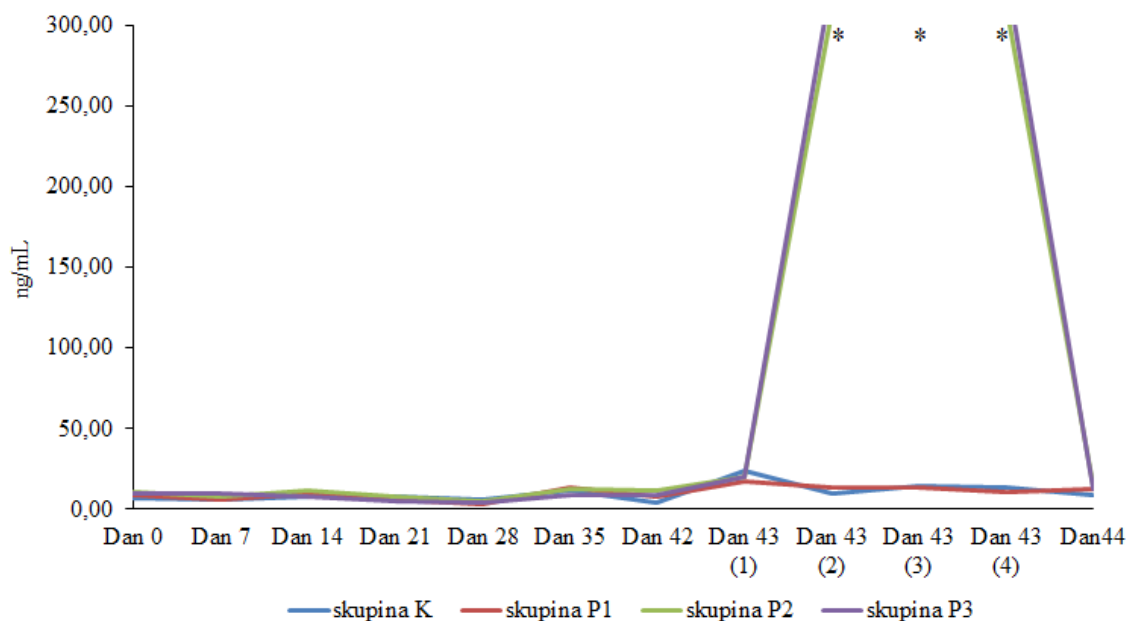


Slika 13. Termografski prikazi leđa zamorčića. (A) termografski prikaz leđa zamorčića iz skupine K; (B) termografski prikaz leđa zamorčića iz skupine P1; (C) termografski prikaz leđa zamorčića iz skupine P2; (D) termografski prikaz leđa zamorčića iz skupine P3.

5.5. Razine kortizola određene u uzorcima sline

Na slici 14. prikazana je dinamika kretanja srednjih vrijednosti razina kortizola određenih u slini zamorčića na dane izuzimanja uzoraka.

Sve do drugog izuzimanja uzoraka sline na 43. dan pokusa nisu zabilježene značajne razlike u srednjim vrijednostima razina kortizola u slini između pojedinih skupina zamorčića, kao niti između različitih dana uzorkovanja unutar iste skupine. Značajan porast razina kortizola zabilježen je u drugom setu uzoraka sline prikupljenih na 43. dan pokusa od zamorčića iz skupina P2 i P3 kojima je ranije tog dana primijenjen kortizol. Razine kortizola određene u slini zamorčića iz skupina P2 i P3 ostale su značajno više od onih zabilježenih u slini zamorčića iz skupina K i P1 i u trećem i četvrtom setu uzoraka prikupljenih na 43. dan pokusa. Nisu zabilježene značajne razlike između pojedinih skupina zamorčića u srednjim vrijednostima razina kortizola određenima u uzorcima sline prikupljenima na 44. dan pokusa.

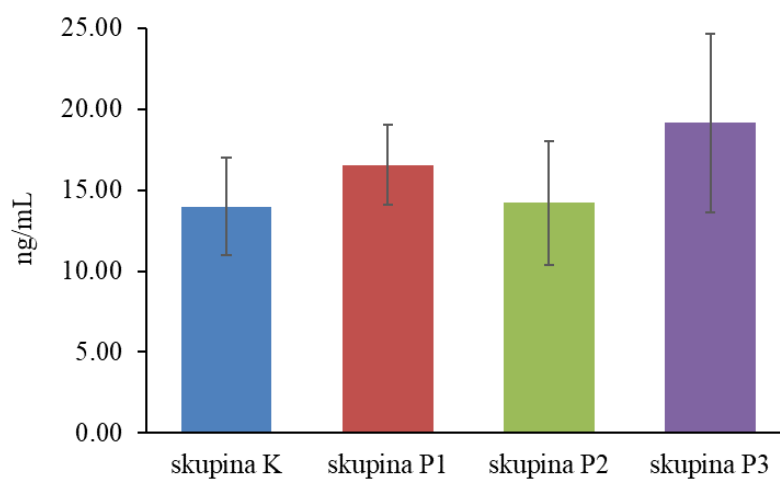


Slika 14. Srednje vrijednosti razina kortizola zabilježenih u uzorcima sline prikupljenima na određene dane pokusa

* statistički značajno više razine kortizola u odnosu na razine kortizola u skupinama K i P1

5.6. Razine kortizola određene u uzorcima krvi

Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike između skupina u srednjim vrijednostima razina kortizola određenim u krvi eutanaziranih zamorčica na 44. dan pokusa (slika 15).



Slika 15. Srednje vrijednosti razina kortizola zabilježenih u krvi eutanaziranih zamorčica na 44. dan pokusa

5.7. Rezultati hematološke pretrage

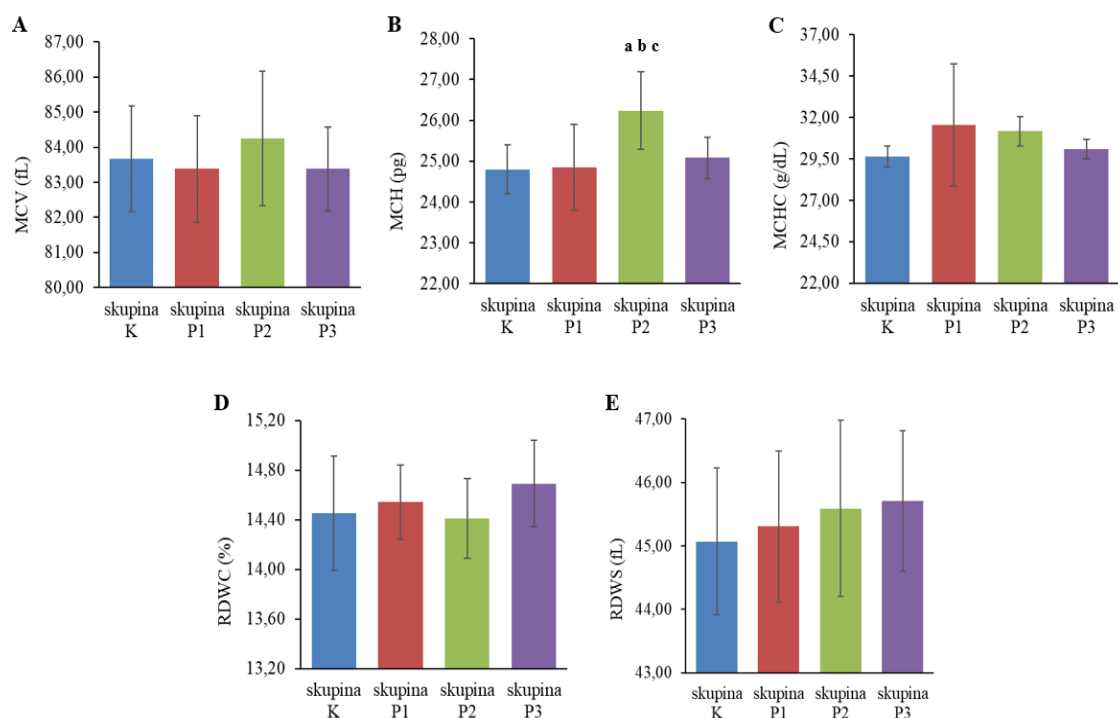
Rezultati eritrocitnih hematoloških pokazatelja prikazani su u tablici 6. i na slici 16., leukocitnih hematoloških pokazatelja na slikama 17. i 18., a rezultati trombocitnih hematoloških pokazatelja u tablici 7.

5.7.1. Eritrocitni hematološki pokazatelji

Statističkom analizom rezultata istraživanih eritrocitnih pokazatelja utvrđeno je kako se jedino srednje vrijednosti pokazatelja MCH značajno razlikuju između pojedinih skupina zamorčica. Analiza rezultata pokazala je da je srednja vrijednost MCH u skupini P2 značajno veća nego u preostale tri skupine zamorčica.

Tablica 6. Rezultati eritrocitnih hematoloških pokazatelja broj eritrocita, hemoglobin i hematokrit određenih u krvi zamorčica na 44. dan pokusa prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija srednje vrijednosti

Hematološki pokazatelj	Skupina			
	K	P1	P2	P3
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	$5,40 \pm 0,42$	$5,50 \pm 0,15$	$5,44 \pm 0,27$	$5,63 \pm 0,34$
Hemoglobin (g/dL)	$13,40 \pm 1,17$	$13,66 \pm 0,54$	$14,25 \pm 0,86$	$14,11 \pm 1,03$
Hematokrit (%)	$45,21 \pm 3,27$	$45,83 \pm 1,23$	$45,75 \pm 1,82$	$46,94 \pm 2,56$



Slika 16. Srednje vrijednosti i standardne devijacije eritrocitnih hematoloških pokazatelja MCV (fL), MCH (pg), MCHC (g/dL), RDWC (%) i RDWS (fL) određenih u krvi zamorčica na 44. dan pokusa

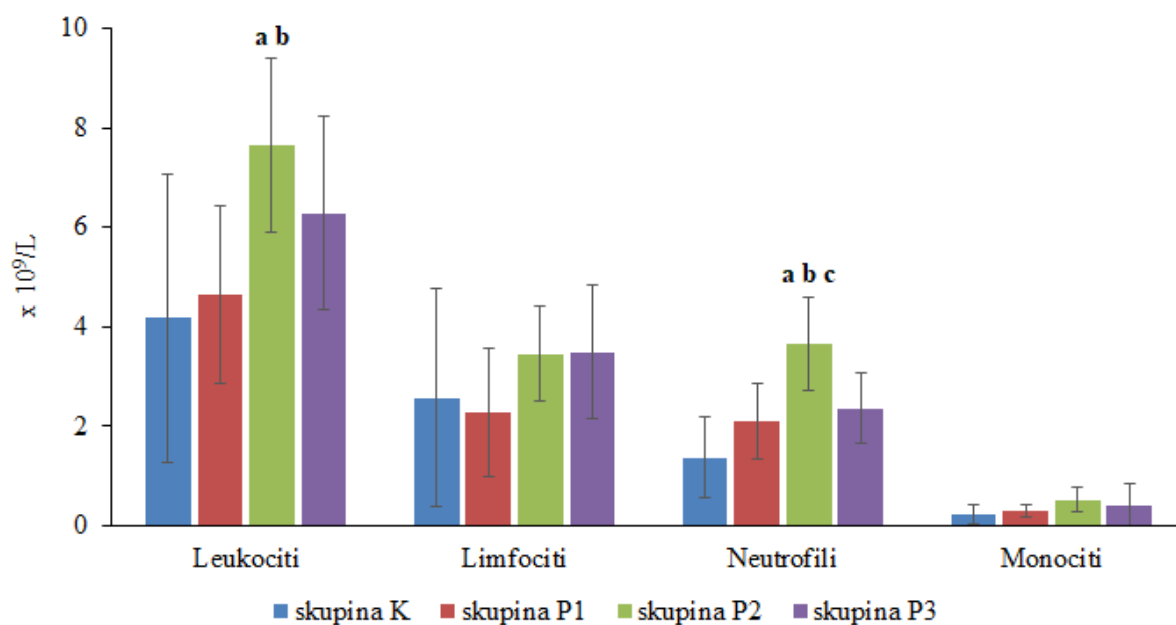
a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu K

b - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu P1

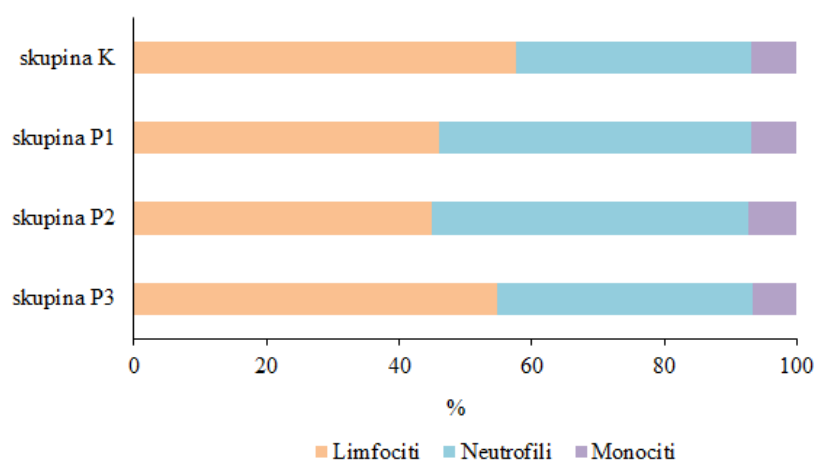
c - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu P3

5.7.2. Leukocitni hematološki pokazatelji

Statistički značajne razlike srednjih vrijednosti istraživanih leukocitnih hematoloških pokazatelja između pojedinih skupina zamorčica u pokusu zabilježene su za broj leukocita i broj neutrofila. Srednja vrijednost pokazatelja broj leukocita zabilježena u skupini P2 bila je značajno veća od srednje vrijednosti istog pokazatelja zabilježene u skupini K. Srednja vrijednost pokazatelja broj neutrofila zabilježena u skupini P2 bila je značajno veća od srednjih vrijednosti istog pokazatelja zabilježenih u sve tri preostale skupine zamorčica.



Slika 17. Rezultati leukocitnih hematoloških pokazatelja broj leukocita, broj neutrofila, broj limfocita i broj monocita istraživanih u krvi zamorčića na 44. dan pokusa prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija srednje vrijednosti
a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu K
b - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu P1
c - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu P2



Slika 18. Udio limfocita, neutrofila i monocita u ukupnom broju leukocita

5.7.3. Trombocitni hematološki pokazatelji

Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u srednjim vrijednostima niti jednog trombocitnog hematološkog pokazatelja.

Tablica 7. Rezultati trombocitnih hematoloških pokazatelja istraživanih u krvi zamorčica na 44. dan pokusa prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija srednje vrijednosti

Hematološki pokazatelj	Skupina			
	K	P1	P2	P3
Trombociti ($\times 10^9/L$)	$133,83 \pm 53,57$	$114,50 \pm 52,94$	$96,88 \pm 48,13$	$61,50 \pm 55,85$
Trombokrit (%)	$0,10 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,04$
MPV (fL)	$7,62 \pm 0,84$	$7,66 \pm 0,73$	$7,91 \pm 0,50$	$7,94 \pm 0,60$
PDWC (%)	$31,13 \pm 2,52$	$31,33 \pm 1,62$	$31,94 \pm 1,84$	$30,14 \pm 1,39$
PDWS (fL)	$9,37 \pm 1,86$	$9,59 \pm 1,19$	$9,86 \pm 1,38$	$8,88 \pm 0,93$

5.8. Serumski biokemijski pokazatelji

Rezultati biokemijskih pokazatelja istraživanih u serumima zamorčića na 44. dan pokusa prikazani su u tablici 8. kao srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti.

Aktivnosti enzima (alkalna fosfataza, alanin aminotransferaza i amilaza) izražene su u međunarodnim jedinicama enzimске aktivnosti (količina enzima koja katalizira pretvorbu jednog mikromola supstrata u minuti pri standardiziranim okolnostima) po litri krvi (U/L), a razine istraživanih proteina (albumini, globulini i ukupni proteini) u gramima po litri krvi (g/L). Razine istraživanih supstrata i metabolita izražene su milimolima po litri krvi (mmol/L) (glukoza, urea nitrat) ili u mikromolima po litri krvi ($\mu\text{mol/L}$) (bilirubin i kreatinin). Razine istraživanih elektrolita (natrij, kalij, kalcij, fosfor) izražene su u milimolima po litri krvi (mmol/L).

Statistička analiza pokazala je kako između pojedinih skupina zamorčića nema značajnih razlika u zabilježenim srednjim vrijednostima istraživanih aktivnosti enzima, kao niti u zabilježenim srednjim vrijednostima istraživanih proteina i elektrolita. Značajne razlike između pojedinih skupina zamorčića nisu zabilježene niti za srednje vrijednosti razina metabolita i supstrata glukoza, kreatinin i bilirubin. Međutim, statistički značajnim su se pokazale razlike u zabilježenim srednjim vrijednostima metabolita urea nitrat, pri čemu su vrijednosti zabilježene u skupinama P2 i P3 bile značajno manje od vrijednosti zabilježenih u skupinama K i P1.

Tablica 8. Rezultati biokemijskih pokazatelja istraživanih u serumima zamorčića na 44. dan pokusa prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija srednje vrijednosti

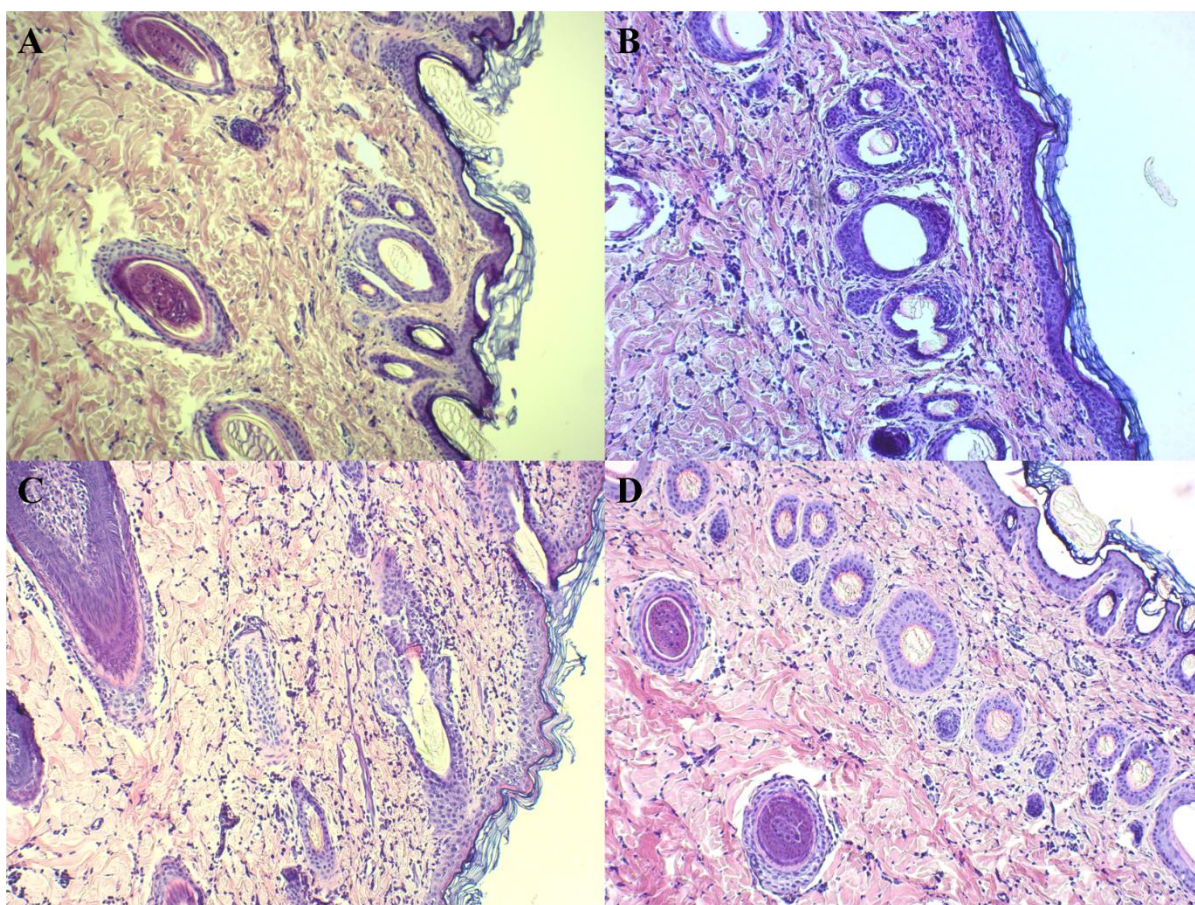
Biokemijski pokazatelj	Skupina			
	K	P1	P2	P3
ALP (U/L)	127,17 $\pm$ 30,65	138,75 $\pm$ 25,10	142,13 $\pm$ 21,46	141,88 $\pm$ 36,36
ALT (U/L)	88,67 $\pm$ 37,11	70,88 $\pm$ 14,43	93,75 $\pm$ 34,32	98,50 $\pm$ 17,25
Amilaza (U/L)	1079,17 $\pm$ 140,95	970,88 $\pm$ 193,03	1018,25 $\pm$ 236,44	1086,38 $\pm$ 220,95
Albumini (g/L)	40,17 $\pm$ 2,93	38,50 $\pm$ 2,39	40,25 $\pm$ 1,39	39,38 $\pm$ 2,97
Globulini (g/L)	5,83 $\pm$ 0,98	6,75 $\pm$ 1,04	6,38 $\pm$ 1,51	7,13 $\pm$ 1,64
Ukupni proteini (g/L)	45,83 $\pm$ 3,37	45,13 $\pm$ 2,36	46,50 $\pm$ 2,00	46,63 $\pm$ 3,07
Glukoza (mmol/L)	8,55 $\pm$ 0,88	9,39 $\pm$ 0,88	11,64 $\pm$ 3,40	10,58 $\pm$ 2,02
Bilirubin (μ mol/L)	3,50 $\pm$ 1,22	4,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	4,13 $\pm$ 0,35
Urea nitrat (mmol/L)	7,82 $\pm$ 0,60	7,18 $\pm$ 0,80	5,45 $\pm$ 0,45 ^{ab}	6,16 $\pm$ 0,60 ^{ab}
Kreatinin (μ mol/L)	38,17 $\pm$ 13,69	28,88 $\pm$ 18,76	36 $\pm$ 22,21	25,25 $\pm$ 12,96
Natrij (mmol/L)	141,83 $\pm$ 4,02	140,75 $\pm$ 1,04	140,13 $\pm$ 1,36	139,38 $\pm$ 1,19
Kalij (mmol/L)	6,52 $\pm$ 1,29	5,86 $\pm$ 1,45	5,88 $\pm$ 1,85	7,30 $\pm$ 1,37
Kalcij (mmol/L)	2,78 $\pm$ 0,10	2,83 $\pm$ 0,09	2,80 $\pm$ 0,13	2,76 $\pm$ 0,08
Fosfor (mmol/L)	2,15 $\pm$ 0,16	2,07 $\pm$ 0,13	1,97 $\pm$ 0,28	2,15 $\pm$ 0,24

a - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu K

b - statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na skupinu P1

5.9. Rezultati patohistološke analize

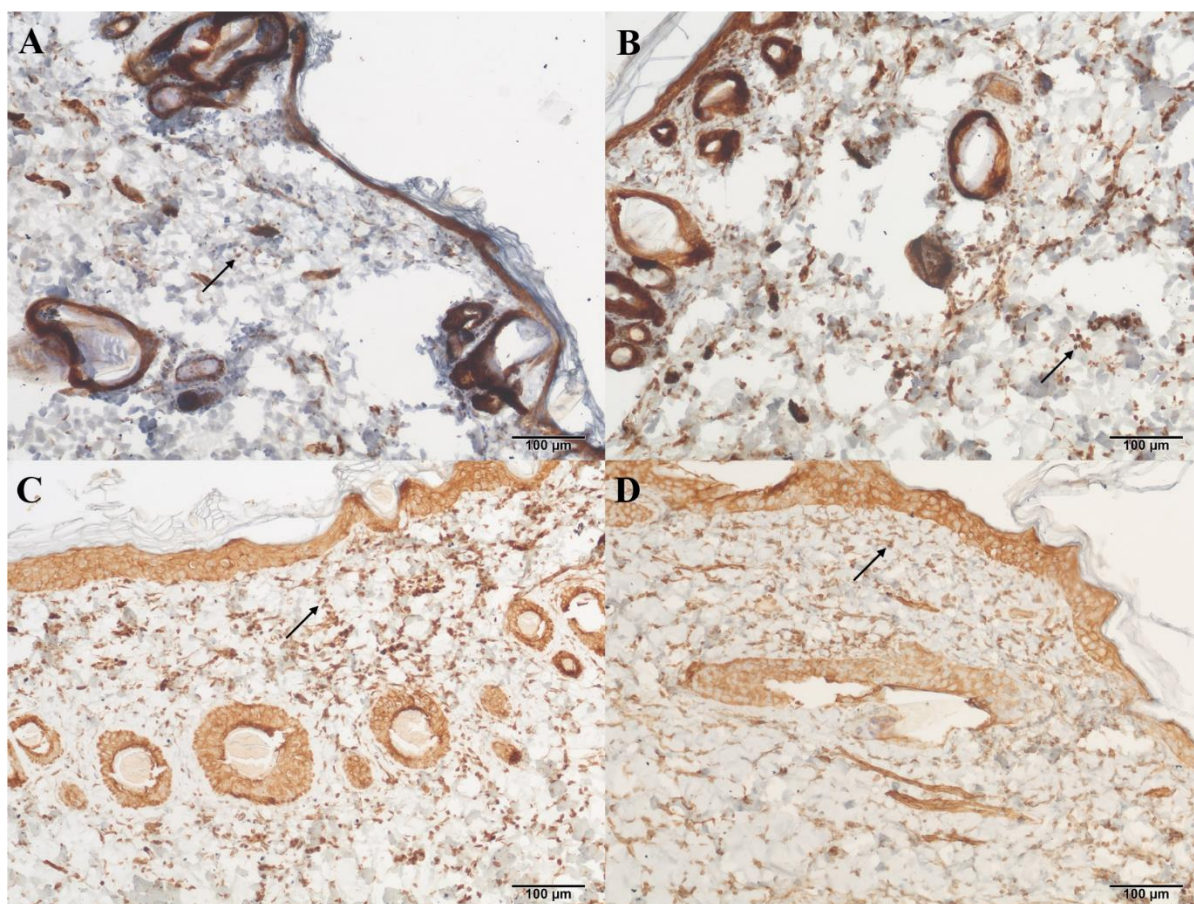
Rezultati patohistološke analize uzoraka kože nesenibiliziranih zamorčica iz kontrolne skupine i uzoraka kože senzibiliziranih zamorčica iz pokusnih skupina uzetih s mjesta primjene otopine A međunarodnog standarda bPPD-a prikazani su na slici 19.



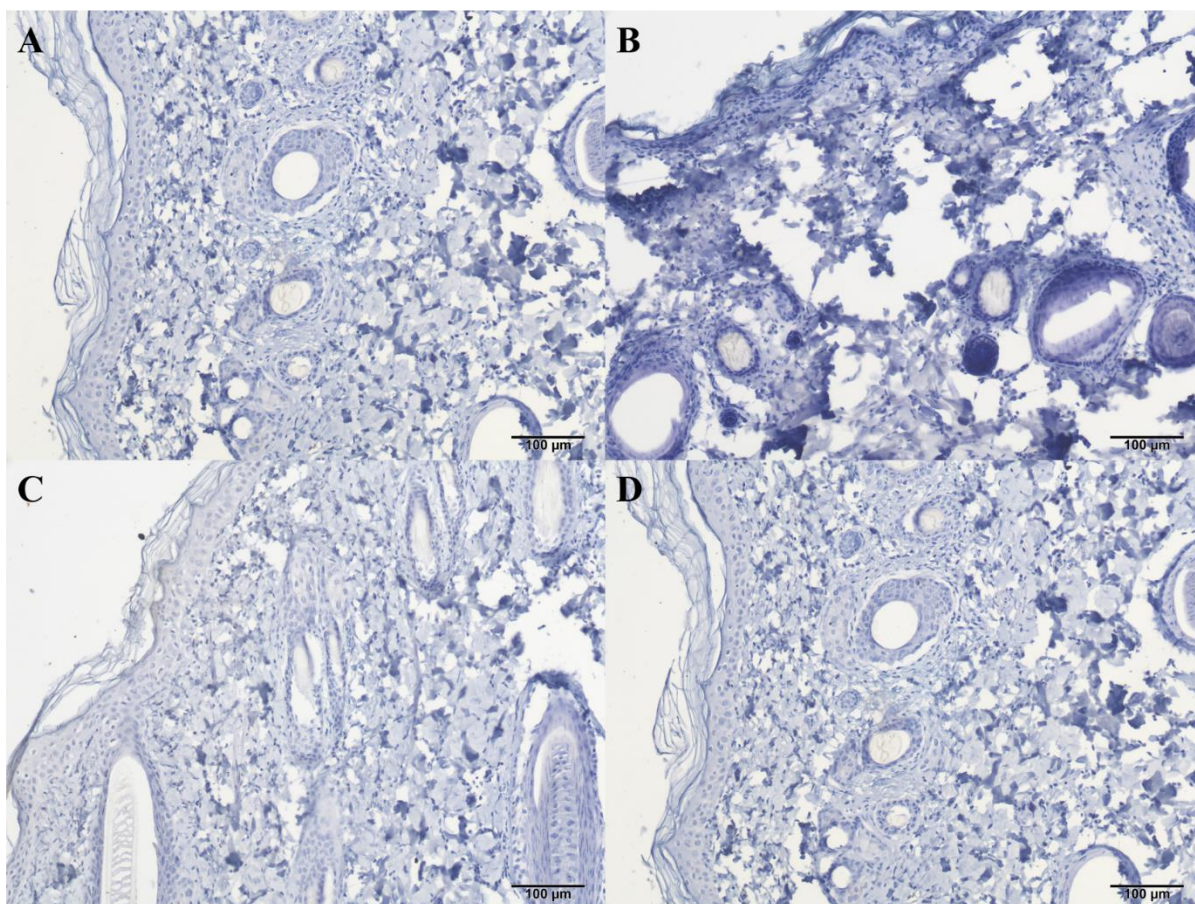
Slika 19. Histološki prikazi kože uzorkovane s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a (20x). (A) skupina K – nisu vidljive patohistološke promjene; (B) (C) (D) skupine P1, P2, P3 - uočava se perivaskularna stanična infiltracija koju sačinjavaju pretežito mononuklearne stanice.

5.10. Rezultati imunohistokemijske analize

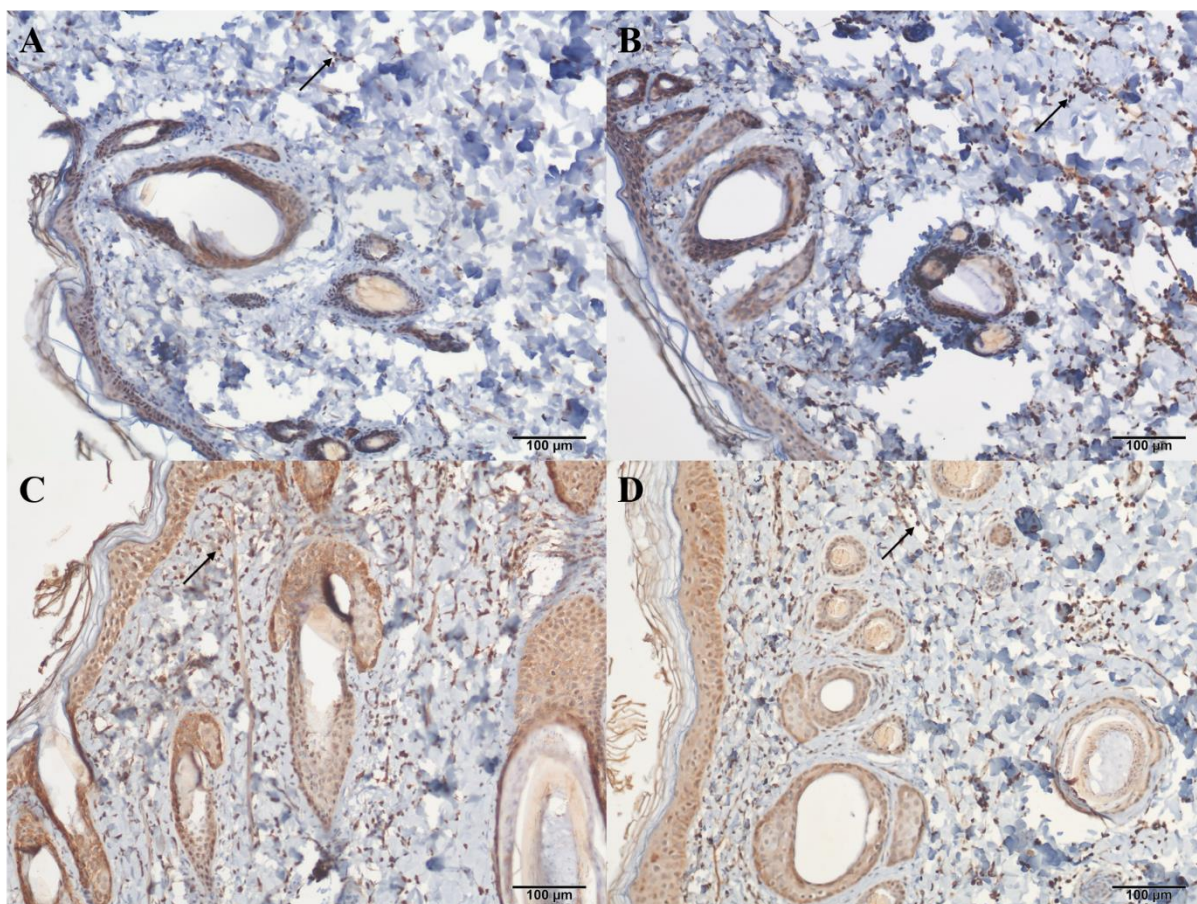
Rezultati imunohistokemijskog bojenja uzoraka kože uzetih s mjesta primjene otopine međunarodnog standarda bPPD-a protutijelima navedenim u odjeljku 4.3.8. prikazani su na slikama 20 – 26.



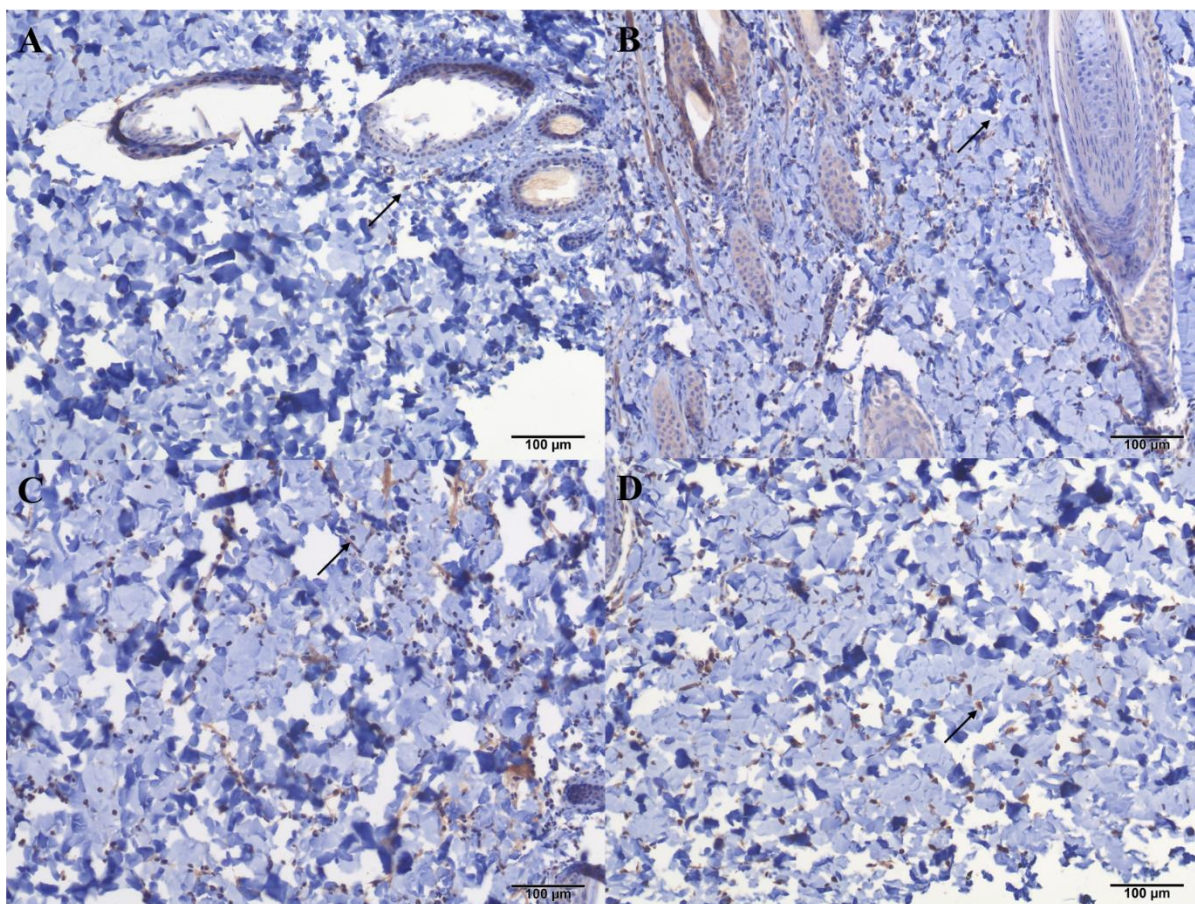
Slika 20. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na CD4 (strelice) (20x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



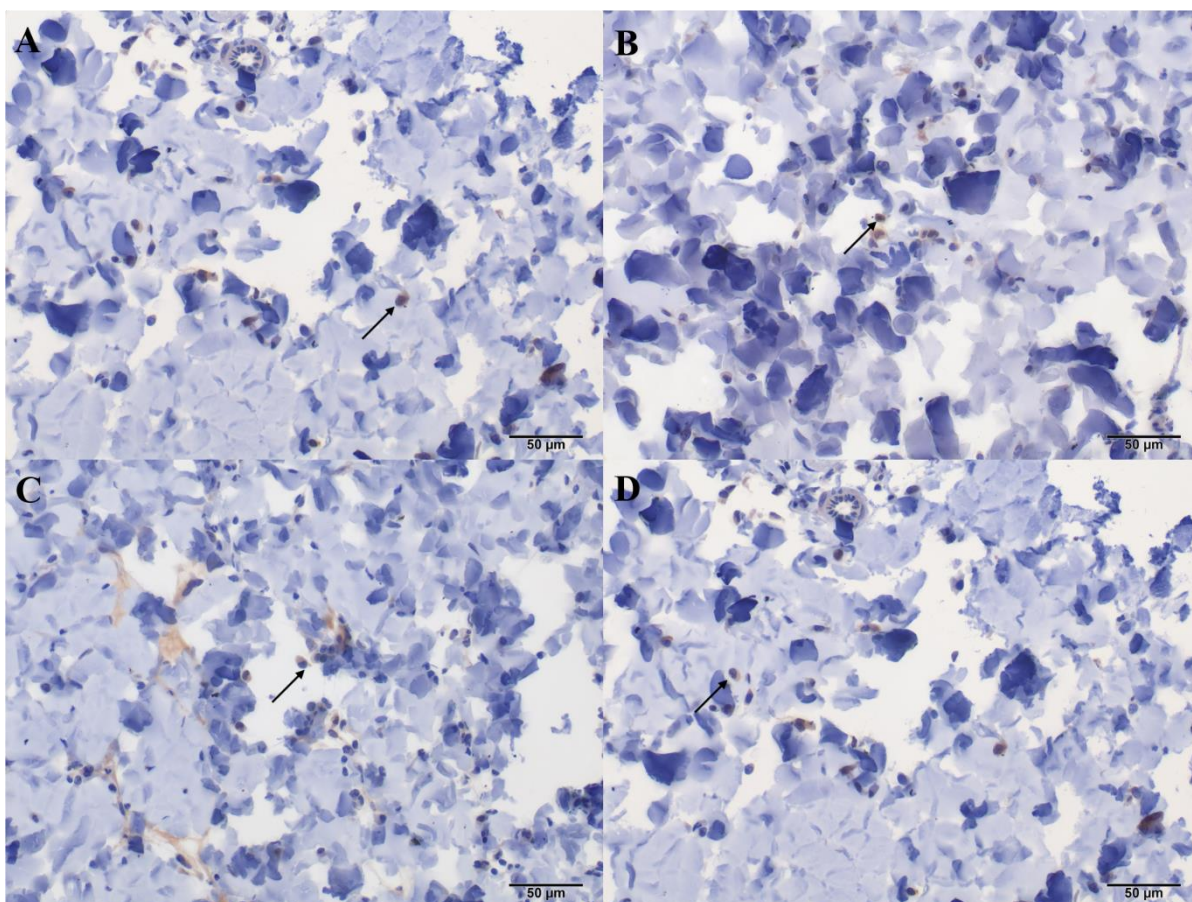
Slika 21. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a negativno na CD8 (20x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



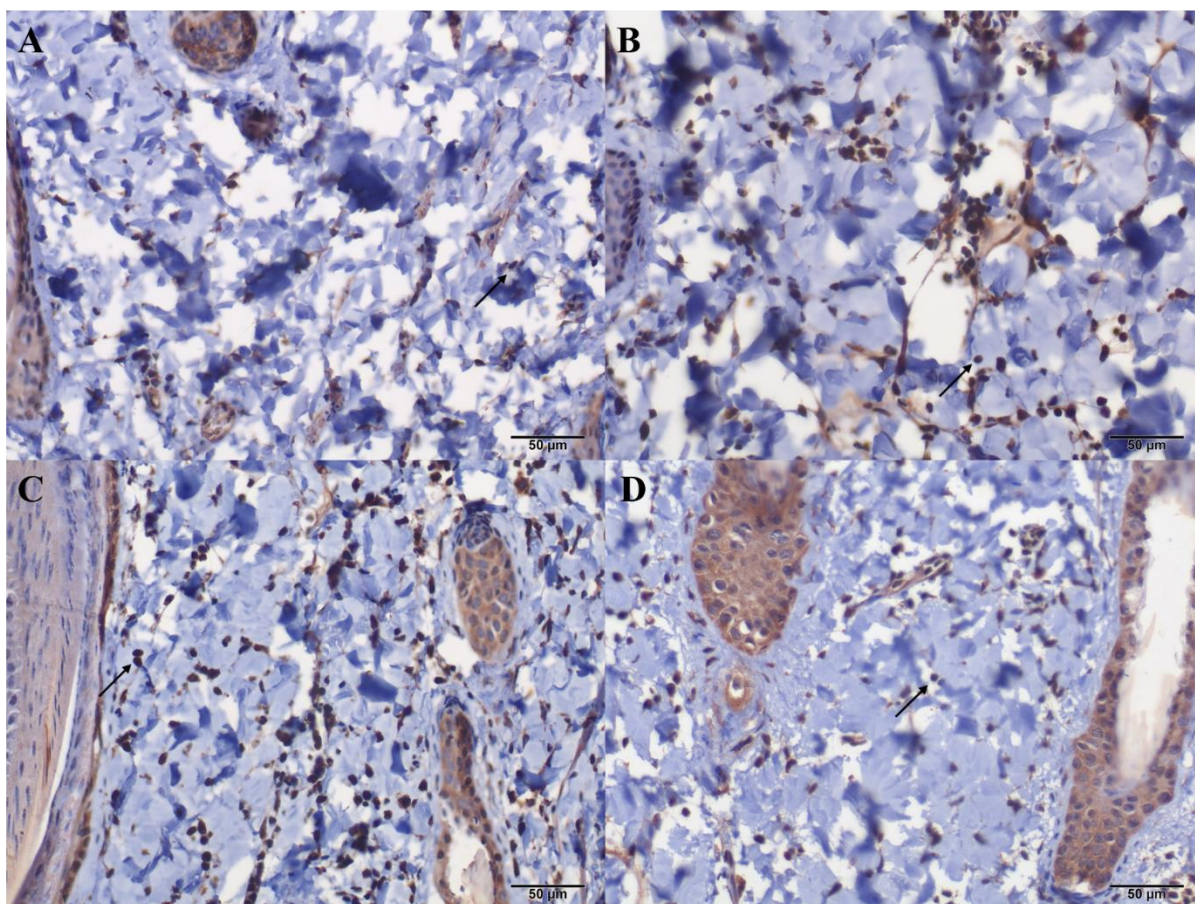
Slika 22. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na CD68 (strelice) (20x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



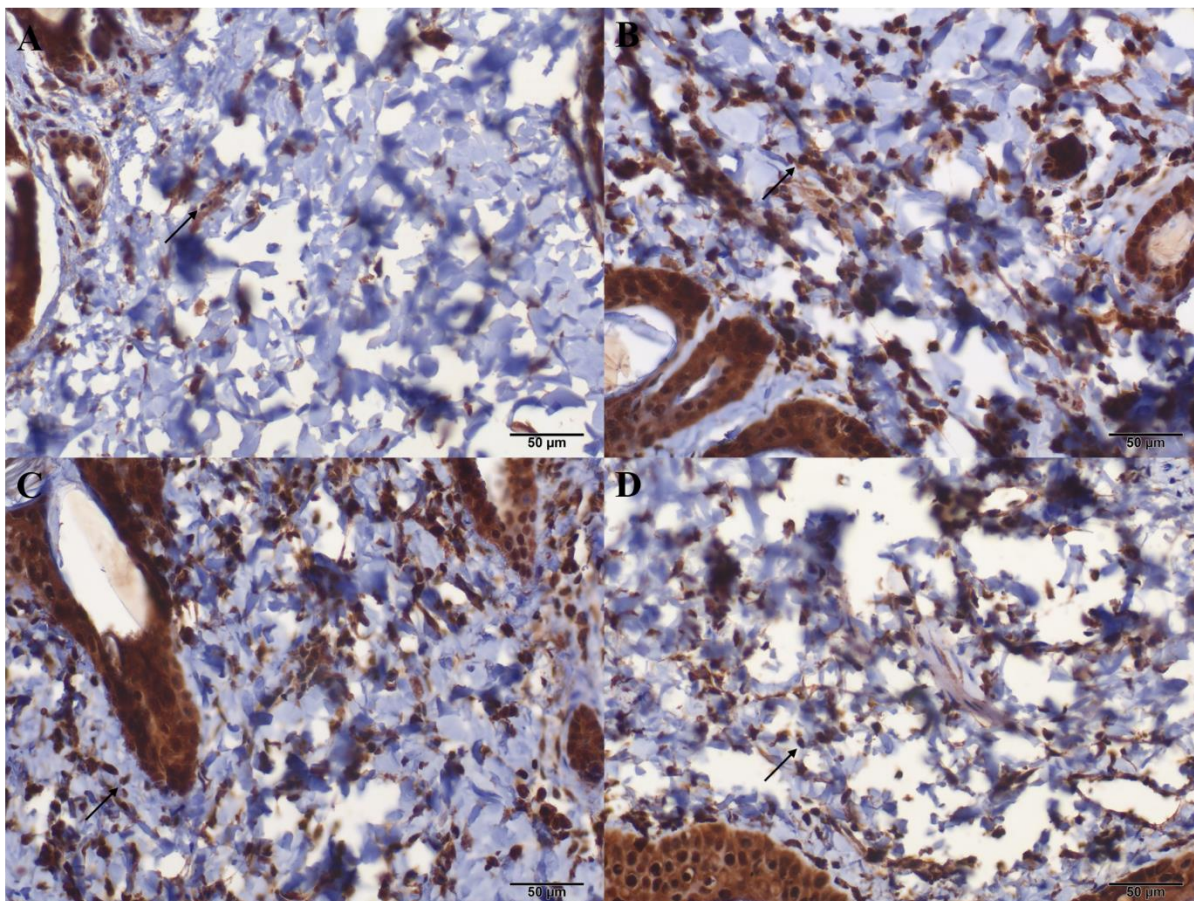
Slika 23. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na IL-1 (strelice) (20x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



Slika 24. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na IL-6 (strelice) (40x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



Slika 25. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na TNF- α (strelice) (40x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.



Slika 26. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože s mjesta primjene otopine A (500 i.j. bPPD-a/mL) međunarodnog standarda bovinog bPPD-a pozitivno na IFN- γ (strelice) (40x). (A) skupina K; (B) skupina P1; (C) skupina P2, (D) skupina P3.

6. RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja je kao jedan od pokazatelja zdravstvenog stanja te utjecaja istraživanih tvari kortizola i propolisa na zdravlje praćena tjelesna masa zamorčića. Na dan prijema u nastambu HVI-a kada su zamorčići nasumičnim odabirom podijeljeni u četiri skupine nije bilo statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima tjelesnih masa zamorčića između pojedinih skupina. Uzevši u obzir da su sve četiri skupine zamorčića tijekom razdoblja prilagodbe držane u istim uvjetima, a da se srednja vrijednost tjelesne mase zamorčića iz skupine P2 značajno razlikovala od srednje vrijednosti tjelesne mase zamorčića iz skupine K već na dan 0 pokusa (tablica 5.) kada zamorčićima još uvijek nije bila primijenjena niti jedna od istraživanih tvari, možemo zaključiti da istraživane tvari nisu uzrok zabilježenoj razlici u tjelesnim masama na dan 0 pokusa. Nadalje, na dan 0 pokusa, tj. na dan senzibilizacije zamorčića iz pokusnih skupina, tjelesne mase svih zamorčića u pokusu odgovarale su uvjetima propisanim u protokolu određivanja aktivnosti bPPD-a opisanom u Ph. Eur. monografiji 01/2008:0536 (400 - 600 g) stoga smatramo da zabilježene razlike u tjelesnoj masi na dan 0 pokusa nisu utjecale na rezultate pokusa. Srednje vrijednosti tjelesnih masa zamorčića iz skupine P2 ostale su veće od srednjih vrijednosti tjelesnih masa zamorčića iz skupine K, ali i onih iz skupina P1 i P3, na sve dane mjerenja do kraja pokusa. Međutim, statistički značajne su bile samo razlike u srednjim vrijednostima tjelesnih masa između skupine P2 i skupine K. S obzirom na odnos tjelesnih masa zabilježen na dan 0 pokusa te na to da su zamorčići iz svih skupina tijekom pokusa ujednačeno i stabilno dobivali na tjelesnoj masi (slika 10) ovakvi rezultati bili su donekle očekivani, a kao uzrok možemo isključiti utjecaj istraživanih tvari jer sve do 43. dana pokusa nije bilo razlike u tretmanu skupina K, P1 i P2 (osim senzibilizacije skupina P1 i P2). Kako u niti jednog zamorčića tijekom pokusa nisu zabilježeni simptomi odstupanja od fiziološkog stanja ili promjene ponašanja, kao uzrok zabilježenim razlikama u tjelesnim masama tijekom pokusa možemo isključiti i bolesti što potvrđuju i rezultati hematoloških i biokemijskih pretraga krvi opisani niže u raspravi. Pregledom literature nismo naišli na istraživanja koja bi ukazivala na to da tjelesna masa, osim primjerice u slučaju ozbiljne pothranjenosti u djece (REDDY i sur., 2021.), utječe na rezultate TKT-a. Stoga možemo pretpostaviti kako niti razlike u tjelesnim masama zabilježene na ostale dane mjerenja tijekom pokusa nisu utjecale na ishod pokusa.

Praćenje tjelesne mase zamorčića tijekom pokusa omogućilo nam je i uvid u djelovanje vrste propolisa primjenjivane u ovom istraživanju na taj pokazatelj. Propolis se u novije vrijeme zbog dokazanih antimikrobnih, antioksidativnih i imunostimulirajućih učinaka sve više primjenjuje kao dodatak prehrani domaćih životinja u svrhu sprječavanja infekcija i poboljšanja proizvodnih svojstava životinja, tj. kao prirodna alternativa zabranjenim antibiotskim

promotorima rasta (KABAKCI, 2022.). Međutim, rezultati dostupnih istraživanja vezanih uz utjecaj propolisa na tjelesnu masu različitih vrsta životinja znatno se razlikuju. Meta-analiza rezultata 40 objavljenih istraživanja provedenih u razdoblju od 2003. do 2019. godine pokazala je kako dodavanje propolisa u hranu pozitivno utječe na tjelesnu masu pilića u tovu, pri čemu je učinak ovisan o primijenjenoj dozi propolisa (SADARMAN i sur., 2021.). Osim toga, zabilježen je pozitivan učinak propolisa primijenjenog u hrani na tjelesnu masu nesilica (ÖZKÖK i sur., 2013.), janjadi (CECERE i sur., 2021.), bikova (ZAWADZKI i sur., 2011.) i kunića (SIERRA-GALICIA i sur., 2022). Nasuprot tome, MAHMOUD i sur. (2013.) izvještavaju o negativnom učinku propolisa primijenjenog u hrani na tjelesnu masu tovnih pilića, neovisnom o primijenjenoj dozi, dok CUESTA i sur. (2005.) te MANI i sur. (2006.) nisu zabilježili učinak propolisa na tjelesnu masu orada, odnosno štakora. Rezultati istraživanja potonjih autora u skladu su s rezultatima ovog istraživanja tijekom kojeg nije zabilježen učinak, niti pozitivan niti negativan, propolisa na tjelesnu masu zamorčića u pokusu. Srednje vrijednosti tjelesne mase zamorčića iz skupine P3, kojima je svakodnevno tijekom pokusa primjenjivan propolis, nisu se značajno razlikovale od srednjih vrijednosti tjelesnih masa zamorčića iz preostale tri skupine niti na jedan dan mjerenja iako su na sve dane mjerenja bile veće od srednjih vrijednosti tjelesnih masa zamorčića iz skupina K i P1. Također, tijekom pokusa nisu zabilježene značajne razlike u tjednim prirastima zamorčića između skupina, uz iznimku tjednog prirasta između 21. i 28. dana pokusa kada je tjedni prirast zamorčića iz skupine P2 bio značajno veći od tjednog prirasta zamorčića iz skupine K (slika 11). Međutim, rezultate navedenih istraživanja teško je objektivno sagledati jer su tijekom njih korištene različite vrste propolisa, tj. propolisi podrijetlom s različitih geografskih područja, koji su u hranu za životinje umješavani u različitim oblicima (sirovi ili ekstrahirani, najčešće u etanolu), ali i u različitim dozama. Također, treba uzeti u obzir da se razlikovalo i trajanje primjene propolisa u hrani, ali i dob životinja kojima je primijenjivan. Primjerice, tijekom istraživanja AÇIKGÖZ i sur. (2005.) pokazalo se kako sirovi propolis primijenjivan u hrani u dozi 2000 ppm tijekom prva 3 tjedna tova uzrokuje značajno povećanje tjelesne mase tovnih pilića, dok se tijekom sljedeća 3 tjedna tova taj učinak gubi, tj. propolis primijenjivan u istoj dozi pilićima od 3. do 6. tjedna tova više nema utjecaj na tjelesnu masu tovnih pilića. Isti autori zabilježili su i kako propolis primijenjen u hrani u dozi 4000 ppm tijekom prva 3 tjedna tova uzrokuje značajno smanjenje tjelesne mase tovnih pilića. Nadalje, pri procjeni bioloških učinka propolisa treba uzeti u obzir razlike u građi probavnog sustava, crijevne mikroflore i metabolizmu različitih vrsta životinja koje utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku biološki aktivnih sastavnica propolisa te eventualne interakcije navedenih sastavnica sa spojevima u hrani za životinje (KITAMURA,

2019., SWALLAH i sur., 2020.). U ovom istraživanju korišten je topola tip propolisa s područja općine Bizovac u Osječko-baranjskoj županiji, u čijim je etanolnim i vodenim ekstraktima te kompleksima propolisa i određenih nosača PERAK JUNAKOVIĆ (2023.) tekućinskokromatografskim i spektrofotometrijskim metodama kvantitativno i kvalitativno odredila polifenole pinocembrin, galangin, krizin, kavenu kiselinu i feniletil ester kavene kiseline te potvrdila visoku biodostupnost tijekom simulirane probave *in vitro*. S obzirom na to da su vodeni ekstrakti propolisa biološki najkompatibilniji, tijekom ovog istraživanja zamorčićima je primjenjivan vodeni ekstrakt propolisa bez nosača koji sadržava višestruko niže koncentracije navedenih polifenola te stoga možemo reći da su dobiveni rezultati djelomično očekivani. Međutim, rezultati ovog istraživanja mogu biti dobra polaznica za daljnja istraživanja učinaka na drugačiji način pripremljenih ekstrakata propolisa s područja kontinentalne Hrvatske na metabolizam hranjivih tvari i tjelesnu masu monogastričnih životinja te mehanizama u pozadini tih učinaka, a čiji bi rezultati mogli biti značajni u industriji hrane za životinje i animalnoj proizvodnji.

S obzirom na to da hematološki i biokemijski pokazatelji pružaju dobar uvid u zdravstveno stanje, kao i u fiziološki odgovor organizma na primjenu različitih tvari i promjene u okolišnim uvjetima, na kraju pokusa neposredno nakon eutanazije izuzeti su i uzorci krvi zamorčića. Prema CLEMONS i SEEMAN (2018.) na referentne vrijednosti hematoloških pokazatelja u zamorčadi znatno utječu pasmina, dob, fiziološki status, hrana, ali i metoda uzorkovanja krvi. Stoga se preporučuje da laboratoriji prije provođenja istraživanja sami utvrde referentne vrijednosti u pokusnih životinja kojima raspolažu. Međutim, s obzirom na to da je tijekom ovog istraživanja u svrhu što manjeg izazivanja stresa zamorčićima u pokusu, krv uzorkovana samo jednom, i to na kraju pokusa, nije bilo moguće uspoređivati utvrđene vrijednosti hematoloških i biokemijskih pokazatelja s vrijednostima navedenih pokazatelja na početku pokusa. Stoga su u svrhu procjene zdravstvenog stanja zamorčića u pokusu rezultati hematoloških i biokemijskih pokazatelja zabilježeni na kraju pokusa uspoređeni s referentnim vrijednostima navedenim u radovima QUESENBERRY i sur. (2012.) i POPOIU i sur. (2021.) koji sadržavaju najpotpunije podatke.

Srednje vrijednosti svih istraživanih eritorocitnih hematoloških pokazatelja zabilježene u sve četiri skupine zamorčića bile su unutar raspona fizioloških vrijednosti, osim srednje vrijednosti pokazatelja RDWS za koji u citiranoj literaturi nema podataka o fiziološkom rasponu vrijednosti. Istraživanja provedena na ljudima i glodavcima pokazuju da povišena razina GK u krvi stimulira eritropoezu te povećava broj eritrocita, razinu hemoglobina u krvi i hematokrit (KING i sur., 1988., BAUER i sur., 1999.; VOORHEES i sur., 2013.). Unatoč tome,

u ovom istraživanju nisu zabilježene značajne razlike u srednjim vrijednostima niti jednog od navedenih pokazatelja između skupina P2 i P3 kojima je primijenjen kortizol i skupina K i P1 koje nisu primile kortizol (tablica 6.). Značajna razlika u srednjim vrijednostima istraživanih eritrocitnih hematoloških pokazatelja između pojedinih skupina zamorčica zabilježena je samo za pokazatelj MCH koji označava prosječnu količinu hemoglobina u eritrocitima (slika 16). Srednja vrijednost navedenog pokazatelja zabilježena u skupini P2 bila je značajno veća od srednjih vrijednosti istog pokazatelja zabilježenih u ostale tri skupine zamorčica, ali je također bila unutar fiziološkog raspona vrijednosti za taj parametar. S obzirom na to te na činjenicu da razliku u srednjim vrijednostima pokazatelja MCH između skupina nisu pratile značajne razlike u srednjim vrijednostima niti jedne druge eritrocitne konstante (MCV, MCHC, RDWC, RDWS), možemo pretpostaviti da je uzrok većoj vrijednosti MCH u skupini P2 u odnosu na ostale skupine biološka varijabilnost između jedinki.

Unutar fiziološkog raspona vrijednosti bile su i srednje vrijednosti svih istraživanih leukocitnih hematoloških pokazatelja osim srednjih vrijednosti broja monocita zabilježenih u skupinama K i P1 koje su bile nešto niže od donjih fizioloških vrijednosti koje su prema POPOIU i sur. (2021.) $0,38 \times 10^9/L$. Međutim, pri interpretaciji dobivenih rezultata treba uzeti u obzir da je krv uzorkovana ubrzo nakon što je zamorčicima primijenjena anestezija. Kombinacija ksilazina i ketamina koja se uobičajeno koristi u anesteziji zamorčica, a koja je korištena i tijekom ovog istraživanja, može znatno promijeniti vrijednosti pojedinih hematoloških i biokemijskih pokazatelja, između ostaloga i značajno smanjiti broj monocita u krvi (WILLIAMS i sur., 2016.). Budući da su i srednje vrijednosti broja monocita u druge dvije skupine (P2 i P3) bile blizu donje fiziološke vrijednosti možemo pretpostaviti da je uzrok monocitopeniji zabilježenoj u skupinama K i P1 anestezija. Ukupan broj leukocita u krvi, ali i udio pojedinih subpopulacija u tom broju, daju uvid u distribuciju leukocita u organizmu i u stanje aktivacije imunskog sustava. Poznato je kako akutni stres i povišenje razine GK u krvi uzrokuju brzu i značajnu redistribuciju leukocita u organizmu. Leukociti napuštaju limfna tkiva i krvlju putuju do ciljnih tkiva, stoga početno povećanje broja svih subpopulacija leukocita u krvi ubrzo zamjenjuju limfocitopenija i monocitopenija dok broj neutrofila u krvi i dalje ostaje povišen (DHABHAR i sur., 2012.). Prema MCKAY i CIDLOWSKI (2003.) povećanje broja neutrofila u krvi nakon primjene GK rezultat je povećanog oslobađanja iz koštane srži, ali i smanjenog odstranjenja iz cirkulacije. Međutim, navedene promjene su kratkotrajne. OLNES i sur. (2016.) su utvrdili kako se broj neutrofila u krvi ljudi kojima je jednokratno primijenjena velika doza hidrokortizona počinje smanjivati približno 12 sati nakon primjene, međutim 24 sata nakon primjene je još uvijek veći od početnog broja neutrofila. Nasuprot tome, broj

limfocita i monocita počinje rasti približno 8 sati nakon primjene hidrokortizona, a 24 sata nakon primjene broj im je značajno veći od početnog broja. S obzirom na to, možemo reći kako su rezultati leukocitnih hematoloških pokazatelja zabilježeni u skupinama K, P1 i P2 u ovom istraživanju očekivani. Na slici 17. vidljivo je kako je veći broj leukocita zabilježen u skupini P2 u odnosu na skupine K i P1 najvjerojatnije posljedica znatno većeg broja neutrofila u navedenoj skupini. U krvi zamorčica fiziološki se nalazi veći broj limfocita nego neutrofila, a kod tzv. stresnog leukograma, koji se u sisavaca javlja kao odgovor na oboljenja i stres, broj limfocita i neutrofila u krvi se izjednačava (ANONIMNO, 2019b.), što potvrđuju i rezultati određivanja udjela pojedinih subpopulacija limfocita u krvi zamorčica iz skupina K, P1 i P2. prikazani na slici 18.

Srednje vrijednosti trombocitnih pokazatelja broj trombocita i trombokrit zabilježene u sve četiri skupine zamorčica bile su ispod donjih fizioloških vrijednosti, dok su srednje vrijednosti pokazatelja MPV i PDWS bile unutar fiziološkog raspona vrijednosti. Za pokazatelj PDWC u citiranoj literaturi nisu dati podaci o fiziološkom rasponu vrijednosti. Unatoč velikim razlikama u zabilježenim srednjim vrijednostima ukupnog broja broja trombocita i trombokrita između skupina, statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u srednjim vrijednostima niti jednog trombocitnog hematološkog pokazatelja. Međutim, iz rezultata prikazanih u tablici 7. vidljivo je da su srednje vrijednosti broja trombocita u sve tri pokusne skupine manje nego u kontrolnoj skupini. Broj trombocita se u pokusnim skupinama, počevši od skupine P1 prema skupini P3, sve više smanjuje u odnosu na broj trombocita u skupini K, a u skupini P3 je već približno dvostruko manji u odnosu na skupinu K. Sukladno srednjoj vrijednosti broja trombocita mijenja se i srednja vrijednost trombokrita koji predstavlja volumni udjel trombocita u jedinici volumena krvi, a najmanja je u skupini P3. Prema FITRIA i sur. (2021.), vrijednosti trombocitnih hematoloških pokazatelja znatno ovise o tehnici uzorkovanja krvi. Kada je proces uzorkovanja krvi otežan ili tijekom uzorkovanja dođe do krvarenja trombociti agregiraju zbog čega se često očitava lažno nizak broj trombocita. Poznato je, također, kako krv zamorčica koagulira brže od krvi ostalih glodavaca i čovjeka, stoga se u njihovoj krvi može naći manji broj trombocita (FITRIA i sur., 2021.). S obzirom na to možemo zaključiti kako je uzrok trombocitopeniji zabilježnoj u sve četiri skupine zamorčica te sve većem smanjenju srednjih vrijednosti trombocitnih hematoloških pokazatelja broj trombocita i trombokrit od skupine K prema skupini P3 zamorčica dinamika pokusa. Zamorčici iz skupine P3 žrtvovani su zadnji te je u njih prošlo najviše vremena između anestezije i eutanazije te uzorkovanja krvi. S obzirom na to, na osnovu dobivenih rezultata nije moguće procjenjivati utjecaj primijenjenih tvari na trombocitne hematološke pokazatelje.

Unutar fiziološkog raspona vrijednosti bile su srednje vrijednosti 11 od 14 promatranih biokemijskih pokazatelja zabilježene u svim skupinama zamorčica. Srednje vrijednosti aktivnosti enzima ALT te razine bilirubina zabilježene u svim skupinama zamorčica bile su iznad gornjih fizioloških vrijednosti dok su srednje vrijednosti razine globulina u sve četiri skupine zamorčica bile ispod donjih fizioloških vrijednosti. Međutim, tijekom procjene navedenih rezultata u kontekstu zdravstvenog stanja životinja opet treba uzeti u obzir utjecaj primijenjene anestezije. Istraživanje WILLIAMS i sur. (2016.) pokazuje kako kombinacija ksilazina i ketamina uzrokuje značajno povećanje aktivnosti enzima ALT te razine bilirubina, a značajno snižava razine globulina u krvi zamorčica što odgovara rezultatima zabilježenim u ovom istraživanju. Budući da su odstupanja od fizioloških vrijednosti navedenih pokazatelja zabilježene u sve četiri skupine zamorčica te uzevši obzir kako nisu zabilježene značajne razlike u srednjim vrijednostima navedenih pokazatelja između pojedinih skupina možemo pretpostaviti kako su navedena odstupanja posljedica djelovanja primijenjenih anestetika. Osnovna fiziološka funkcija kortizola je regulacija metabolizma hranjivih tvari, tj. ugljikohidrata, proteina i masti. Kortizol potiče razgradnju proteina i masti te stimulira glukoneogenezu i odlaganje glikogena u jetri. Osim glukokortikoidnog, kortizol ima i mineralokortikoidno djelovanje. Smanjuje izlučivanje natrija, a pojačava izlučivanje kalija i kalcija (MCKAY i CIDLOWSKI, 2003.; YASIR i sur., 2023.). Uzevši sve navedeno u obzir, bilo bi za očekivati kako će se primjena kortizola u ovom istraživanju odraziti na biokemijske pokazatelje krvi zamorčica u pokusu. Budući da su mnoga od navedenih djelovanja vezana uz dozu i trajanje izloženosti kortizolu ne iznenađuje što tijekom ovog istraživanja nisu zabilježene značajne razlike u srednjim vrijednostima određenih biokemijskih pokazatelja između skupina zamorčica koje su primile kortizol i onih koje nisu. Ipak, analiza rezultata pokazala je kako su srednje vrijednosti razina urea nitrata određene u serumima životinja iz obje pokusne skupine kojima je primijenjen kortizol (skupine P2 i P3) statistički značajno manje u odnosu na one određene u serumima životinja iz skupina kojima nije primijenjen kortizol (skupine K i P1). S obzirom da urea nitrat nastaje kao produkt razgradnje proteina i aminokiselina, za očekivati bi bilo kako će njegove razine u krvi zamorčica koji su primili kortizol biti više nego u zamorčica iz preostale dvije skupine. Smanjena razina urea nitrata u krvi najčešće je posljedica prehrane siromašne proteinima, oštećenja jetre, unosa većih količina tekućine ili primjene anaboličkih steroida (WASHINGTON i VAN HOOSIER, 2012a.; ANONIMNO, 2022.). Uzevši u obzir da su svi zamorčici u pokusu hranjeni istom komercijalnom hranom za zamorčice, da nisu zabilježene statistički značajne razlike u aktivnosti jetrenih enzima istraživanih tijekom ovog istraživanja te da su srednje vrijednosti razine urea nitrata zabilježene u skupinama P2 i P3 bile

unutar fiziološkog raspona vrijednosti, možemo pretpostaviti da je uzrok smanjenju razina urea nitrata u navedenim skupinama u odnosu na skupine K i P1 povećan unos tekućine. Naime, kortizol potiče žeđ i izaziva pojačano lučenje urina putem kojeg se urea nitrogen izlučuje iz tijela (WASHINGTON i VAN HOOSIER, 2012.; ANONIMNO, 2022b.).

Iako rezultati brojnih istraživanja dokazuju da propolis utječe na hematološke i biokemijske pokazatelje krvi u različitim vrsta životinja, pregledom literature naišli smo na vrlo malo istraživanja sličnih ovome koja se bave utjecajem propolisa na navedene pokazatelje u uvjetima stresa ili primjene glukokortikoida, stoga je rezultate zabilježene u skupini P3 teško objektivno vrednovati. Rezultati zabilježeni u skupini P3 i prikazani u tablicama 6. i 8. te na slici 16. ukazuju na to da propolis nema značajan učinak na vrijednosti eritrocitnih i biokemijskih pokazatelja krvi u zamorčića izloženih kortizolu. Međutim, srednje vrijednosti leukocitnih hematoloških pokazatelja (slika 17) zabilježene u skupini P3, a posebice srednja vrijednost broja neutrofila koja je bila značajno manja od srednje vrijednosti broja neutrofila u skupini P2, ukazuju na to kako propolis može do određene mjere spriječiti kratkotrajnim izlaganjem kortizolu izazvane promjene u bijeloj krvnoj slici. Nasuprot tome, MOHAMED i sur. (2016.) utvrdili su kako destedodnevna primjena etanolnog ekstrakta propolisa u hrani značajno mijenja vrijednosti eritrocitnih hematoloških pokazatelja u štakora kratkotrajno izloženih toplinskom stresu, tj. povećava broj eritrocita i hematokrit, a smanjuje prosječni volumen eritrocita. Tijekom istog istraživanja zabilježeno je i značajano smanjenje razina bilirubina u krvi štakora koji su primali propolis. Međutim, navedeni autori nisu istraživali utjecaj propolisa na leukocitne hematološke pokazatelje. Uzevši sve navedeno u obzir, smatramo kako su za izvođenje općih zaključaka o utjecaju propolisa na hematološke i biokemijske pokazatelje u krvi u uvjetima izloženosti stresu ili povećanoj razini GK potrebna daljnja sveobuhvatnija istraživanja.

Kako bi se utvrdile fiziološke razine kortizola te procjenila izloženost zamorčića u pokusu stresu, tijekom ovog istraživanja izuzimani su uzorci sline. S obzirom na to da se uzorci sline, za razliku od uzoraka krvi, izuzimaju neinvazivnim metodama koje pacijentu ne uzrokuju nelagodu ili dodatni stres, u evaluaciji izloženosti domaćih životinja stresu sve se više umjesto razine kortizola u krvi određuju razine kortizola u slini (GREGURIĆ GRAČNER i sur., 2018.; CHMELIKOVA i sur., 2020.; CERON i sur., 2022.). Razine kortizola u slini zamorčića proporcionalne su razinama slobodnog, tj. biološki aktivnog, kortizola u serumu stoga su dobar pokazatelj izloženosti stresu (NEMETH i sur., 2016.). Srednje vrijednosti razina kortizola u uzorcima sline prikupljenima tijekom ovog istraživanja prikazane na slici 14. potvrđuju da sve do 43. dana pokusa, kada je zamorčićima iz skupina P2 i P3 primijenjen sintetski analog

kortizola, hidrokortizon, u obliku estera natrijev hidrokortizonsukcinat, nije bilo razlike u tretmanu pojedinih skupina zamorčića tijekom pokusa te da niti jedna skupina zamorčića tijekom pokusa nije bila izložena povećanom stresu, tj. postupcima koji bi mogli utjecati na povišenje razine kortizola te time i na rezultate istraživanja. Srednje vrijednosti razine kortizola određene u prvom setu uzoraka slin prikupljenih na 43. dan pokusa u svim su skupinama zamorčića bile nešto više u odnosu na one zabilježene na prethodne dane pokusa. S obzirom na to da su navedeni uzorci uzeti u 8 sati, za razliku od uzoraka uzetih na dane prije koji su uvijek uzimani u 9 sati i 30 minuta, ovakav rezultat je zbog cirkadijalnog ritma oslobađanja kortizola bio očekivan. Ubrzo nakon intramuskularne primjene kortizola, razine kortizola u slini zamorčića iz skupina P2 i P3 naglo su porasle. Međutim, budući da su porasle iznad gornje razine kvantifikacije korištenog ELISA kita, a da su tijekom cijelog trajanja pokusa dobivane vrlo male količine uzoraka slin zbog čega na velikom broju uzoraka nije bilo moguće ponoviti analizu, nisu mogle biti određene točne srednje vrijednosti razina kortizola u drugom, trećem i četvrtom setu uzoraka slin prikupljenih na 43. dan pokusa od zamorčića iz skupina P2 i P3. Razine kortizola u uzorcima slin zamorčića iz skupina P2 i P3 prikupljenima na 44. dan pokusa vratile su se na vrijednosti zabilježene prije primjene kortizola što dokazuje da je izloženost zamorčića iz navedenih skupina povišenim razinama kortizola bila kratkotrajna. Određivanje razina kortizola u slini u ovom istraživanju pokazalo se dobrom i pouzdanom metodom praćenja izloženosti zamorčića stresu tijekom pokusa, a primijenjena tehnika izuzimanja uzoraka slin je bila jednostavna i brza, nije zahtijevala skup pribor i laboratorijsku opremu te životinjama nije uzrokovala nelagodu ili bol. Međutim, prilikom planiranja sličnih istraživanja treba uzeti u obzir malu količinu slin koju je u malih laboratorijskih životinja moguće dobiti na ovaj način.

Osim u uzorcima slin, razine kortizola određene su i u uzorcima krvi prikupljenima neposredno nakon eutanazije zamorčića. Rezultati prikazani na slici 15. potvrđuju da nije bilo razlika u razinama kortizola između pojedinih skupina zamorčića na 44. dan pokusa. Međutim, budući da su uzorci krvi izuzimani tek nakon eutanazije zamorčića kada nije bilo moguće izuzeti i uzorke slin, tijekom ovog istraživanja nije bilo moguće utvrditi korelaciju između razina kortizola u serumu i razina kortizola u slini.

Ispitivanje biološke aktivnosti, kao i drugih pokazatelja kvalitete, bPPD-a koji se proizvode za tržište provodi se prema točno definiranom protokolu opisanom u Ph. Eur. (vidjeti odjeljak 2.1.5.4.). Budući da predmet ovog istraživanja nije bilo određivanje aktivnosti komercijalnog bPPD-a već utvrđivanje utjecaja kortizola i propolisa na promjere reakcija koje se u senzibilizirane zamorčadi javljaju na mjestima primjene bPPD-a, a na temelju kojih se određuje aktivnost bPPD-a, tijekom ovog istraživanja je napravljeno nekoliko odnaka od

navedenog protokola. U svrhu dobrobiti zamorčića u pokusu te zaštite osoba uključenih u provedbu pokusa za senzibilizaciju zamorčića je umjesto žive korištena topline inaktivirana kultura bakterije *M. bovis*. Nadalje, tijekom pokusa su se pratili samo promjeri reakcija izazvanih otopinama međunarodnog standarda bPPD-a čija je aktivnost poznata, a one su ubrizgavane u kožu zamorčića redoslijedom prikazanim na slici 8.

Promjeri reakcija koje u senzibiliziranih zamorčića nastaju na mjestima primjene bPPD-a ovise o broju i.j. bPPD-a u primijenjenoj dozi (ANONIMNO, 2019a.). Sukladno tome, tijekom ovog istraživanja u sve tri pokusne skupine zamorčića najveće srednje vrijednosti promjera navedenih reakcija zabilježene su na mjestima primjene otopine A, tj. otopine koja je sadržavala najveći broj i.j. PPD-a po mL, a najmanje na mjestima primjene otopine C međunarodnog standarda bPPD-a koja je sadržavala najmanji broj i.j. bPPD u primijenjenoj dozi (slika 12). Navedeni rezultati ujedno su i znak ispravno provedene primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a. Patohistološka analiza uzoraka kože uzetih s mjesta primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a 24 sata nakon primjene pokazala je da se stanični infiltrat vidljiv na uzorcima kože zamorčića iz pokusnih skupina sastoji pretežno od mononuklearnih stanica, tj. makrofaga i limfocita. Ovakav nalaz u skladu je s rezultatima istraživanja BOUGHTON i SPECTOR (1963.) tijekom kojeg se patohistološkom analizom uzoraka kože uzimanih u više navrata tijekom 7 dana nakon primjene različitih razrijeđenja Kochovog tuberkulina pratio razvoj reakcije kasne preosjetljivosti u senzibiliziranih zamočića. Tijekom ovog istraživanja, opisane patohistološke promjene, tj. prisutnost mononuklearnog staničnog infiltrata, bile su najjače izražene na uzorcima kože uzetim s mjesta na koje je primijenjena otopina A međunarodnog standarda PPD-a u sve tri pokusne skupine zamorčića (rezultati nisu prikazani) što je također u skladu s rezultatima koje su tijekom svog istraživanja zabilježili BOUGHTON i SPECTOR (1963.). Zabilježeni rezultati upućuju na to da je mišljenje SARAZZIN i sur. (2009.), donešeno na temelju kompjuterske analize histoloških prikaza i imunohistokemijskog bojenja uzoraka kože ljudi s mjesta primjene hPPD-a, kako otekline koja nastaje na mjestima primjene tuberkulinskih PPD-a nije posljedica edema već lokalnog staničnog infiltrata bilo točno.

Imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože pokazalo je prisutnost velikog broja pomoćničkih T-limfocita na mjestima primjene međunarodnog standarda bPPD-a u sve tri pokusne skupine zamorčića što je bilo za očekivati s obzirom na to da su oni posrednici podtipa IVa kasne preosjetljivosti. Međutim, tijekom ovog istraživanja na mjestima primjene međunarodnog standarda bPPD-a niti u kontrolnih niti u pokusnih zamorčića nisu pronađeni citotoksični T-limfociti (slika 21) što je u suprotnosti s rezultatima istraživanja POULTER i

sur. (1982.), PLATT i sur. (1983.) i SARAZZIN i sur. (2009.) koji su imunohistokemijskim bojenjem uzoraka kože ljudi utvrdili kako je omjer pomoćničkih i citotoksičnih T-limfocita na mjestima primjene hPPD-a u senzibiliziranih ljudi 2:1. Uzrok negativnog imunohistokemijskog bojenja na prisustvo citotoksičnih T-limfocita u ovom istraživanju najvjerojatnije je krivi odabir protutijela ili pogrešno razrjeđenje i trajanje inkubacije uzoraka u navedenom protutijelu. Naime, unatoč tome što se zamorčad već desetljećima vrlo učestalo koristi u raznim medicinskim istraživanjima, komercijalna protutijela namijenjena za imunohistokemijsko bojenje čija je reaktivnost dokazana na zamorčićima su vrlo rijetka. Stoga su tijekom ovog istraživanja za imunohistokemijsko bojenje uzoraka kože zamorčića korištena komercijalna protutijela čija je reaktivnost dokazana na uzorcima tkiva drugih glodavaca ili ljudi fiksiranim u formalinu te potom uklopljenima u parafin u razrjeđenjima opisanima u objavljenoj literaturi.

Iako se u literaturi nalazi vrlo velik broj istraživanja koja se bave utjecajem stresa i povećanih razina GK na imunost, većina ih je orijentirana na istraživanje mehanizama putem kojih stres ili GK suprimiraju imunosne reakcije karakteristične za pojedine bolesti. Međutim, u posljednja dva desetljeća značajno se povećao interes za istraživanjem proupalnih učinaka stresa i GK te mogućih praktičnih primjena takvih učinaka. Poznato je kako liječenje pojedinim GK-ima može uzrokovati lažno negativne rezultate pri dijagnostici tuberkuloze TKT-om u goveda (DOHERTY i sur., 1995.) i ljudi (BELARD i sur., 2011.). Ipak, novija istraživanja pokazuju kako u određenim uvjetima kratkotrajna izloženost povećanim razinama endogenih GK poput one izazvane akutnim stresom može stimulirati staničnu imunost kojom su posredovane reakcije kasne preosjetljivosti. Prema DHABHAR i sur. (2002.), svrha redistribucije leukocita uzrokovane povišenjem razina GK tijekom akutnog izlaganja stresu je pojačavanje imunosnog nadzora u tkivima i organima u koja leukociti odlaze iz cirkulacije, a koja mogu predstavljati ulazna vrata infekcije ili u kojima može doći do ozljede. Jedan od takvih organa je i koža. Isti autor navedeno povećanje broja leukocita u koži smatra odgovornim za pojačanje imunosnog odgovora na infekciju ili ozljedu kože koji uslijede nakon izlaganja akutnom stresu. Primjerice, u štakora izloženih akutnom stresu neposredno prije nego im se u kožu uške ubrizgalo kemijsko sredstvo na koje su senzibilizirani zabilježeno je značajno veće zadebljanje kože uške nego u senzibiliziranih štakora koji prije primjene navedenog kemijskog sredstva nisu bili izloženi akutnom stresu. Tijekom istog istraživanja je na mjestima primjene navedenog kemijskog sredstva u štakora izloženih akutnom stresu utvrđen značajno veći broj leukocita, ali i povećana ekspresija gena koji kodiraju za proupalne citokine (DHABHAR i MCEWEN, 1996.). Rezultati patohistološke analize i imunohistokemijskog bojenja uzoraka kože prikupljenih od zamorčića iz pokusnih skupina tijekom ovog istraživanja u skladu su s

rezultatima navedenih istraživača. Naime, patohistološka analiza pokazala je kako je stanična infiltracija jače izražena na uzorcima kože zamorčića iz skupine P2 kojoj je 3 sata prije primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a primijenjen kortizol nego na uzorcima kože zamorčića iz skupine P1 kojoj nije primijenjen kortizol, neovisno o primijenjenoj otopini međunarodnog standarda bPPD-a (slika 19). Također, na uzorcima kože zamorčića iz skupine P2 je imunohistokemijskim bojenjem utvrđena nešto veća prisutnost istraživanih proupalnih citokina, a posebice citokina IFN- γ , koji je prema DHABHAR i sur. (2000.) glavni citokin odgovoran za pojačanje intenziteta reakcije kasne preosjetljivosti uzrokovano kortizolom (slike 23 - 26). Ipak, tijekom ovog istraživanja nisu utvrđene značajne razlike u srednjim vrijednostima promjera reakcija nastalih na mjestima primjene različitih otopina međunarodnog standarda bPPD-a između skupine P2 i skupine P1. Međutim, unatoč tome što se nije radilo o statistički značajnim razlikama, iz rezultata prikazanih na slici 12. vidljivo je kako su najveće srednje vrijednosti promjera navedenih reakcija zabilježene u zamorčića iz skupine P2, neovisno o primijenjenoj otopini međunarodnog standarda bPPD-a. Opisani rezultati očitavanja reakcija na otopine međunarodnog standarda bPPD-a te patohistoloških i imunohistokemijskih analiza uzoraka kože ukazuju na to da povišenje razina kortizola koje prethodi primjeni bPPD-a, tj. sekundarnom kontaktu senzibiliziranih zamorčića s antigenom koji je izazvao senzibilizaciju, ipak pojačava reakciju kasne preosjetljivosti, iako ne u značajnoj mjeri. Kako je već navedeno u uvodnom dijelu, način na koji će GK djelovati na imunski sustav ovisi o vremenu i trajanju njihovog djelovanja u odnosu na početak imunskog odgovora, tj. na infekciju ili ozljedu. Prema YEAGER i sur. (2016.) proupalno djelovanje GK izraženo je u uvjetima kada nakon kratkotrajnog perioda (nekoliko sati) tijekom kojeg su razine GK povišene uslijedi period u kojemu se razine GK vraćaju na normalne vrijednosti, a tijekom kojeg imunostane stanice, posebice one izvršne, prolaze kroz transkripcijske i fenotipske promjene koje ih pripremaju za pojačani odgovor na infekciju ili ozljedu koji uslijede. Proupalni učinci GK javljaju se nekoliko sati nakon povišenja (i naknadnog vraćanja razina GK na normalne vrijednosti), a mogu potrajati i do tjedan dana. Budući da je tijekom ovog istraživanja kortizol primijenjen zamorčićima 3 sata prije primjene međunarodnog standarda bPPD-a te da su u vrijeme primjene međunarodnog standarda bPPD-a njegove razine još uvijek bile značajno povišene možemo pretpostaviti kako je nedostatak navedenog „pripremnog“ perioda razlog što zabilježeno povećanje promjera reakcija nastalih na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a uzrokovano kortizolom u ovom slučaju nije bilo značajno.

Uzevši sve navedeno u obzir smatramo kako rezultati očitavanja reakcija nastalih na mjestima primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a, kao i rezultati patohistološke i

imunohistokemijske analize uzoraka kože uzetih s mjesta primjene otopina međunarodnog standarda bPPD-a zabilježeni u skupini P2 daju pozitivan odgovor na postavljeno istraživačko pitanje da li kortizol primijenjen jednokratno prije primjene bPPD-a može pojačati reakciju kasne preosjetljivosti, ali i stvaraju potrebu za daljnjim istraživanjem ove teme, tj. za utvrđivanjem mehanizama koji dovode do opisanog proupalnog djelovanja kortizola, te daju naznaku mogućih praktičnih doprinosa koji će proizaći iz rezultata takvih istraživanja.

Uz propolis se vežu mnogobrojni blagotvorni učinci na zdravlje. Protuupalni i imunostimulatorni učinci propolisa dobro su poznati i detaljno opisani u literaturi, a u posljednje vrijeme se sve više istražuje i utjecaj propolisa na oslobađanje GK tijekom izloženosti stresu (MORSY i sur., 2021.), kao i mogućnost primjene propolisa kao sredstva za ublažavanje štetnih učinaka na zdravlje izazvanih stresom ili kroničnom izloženosti povišenim razinama GK, poput primjerica pada imuniteta, osjećaja umora i slabosti, depresije, tjeskobe i slično (SINANOVIĆ i sur., 2020.). Međutim, prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje mogućnosti ublažavanja proupalnih i imunostimulatornih učinaka GK, tj. kortizola, primjenom propolisa. Poznato je kako biološka djelovanja propolisa ovise o mnogobrojnim faktorima, primjerice o botaničkom podrijetlu, sastavu i načinu ekstrakcije propolisa, ali i o primijenjenoj dozi te trajanju primjene (WAGH, 2013.). Pretpostavka ovog istraživanja bila je da će topola tip propolisa s područja kontinentalne Hrvatske primjenjivan u obliku vodenog ekstrakta svakodnevno tijekom trajanja pokusa umanjiti proupalni učinak jednokratno primijenjenog kortizola na intenzitet imunosnog odgovora te na taj način spriječiti moguće povećanje reakcija na koži uzrokovano kortizolom. Međutim, analiza rezultata očitavanja reakcija nastalih na mjestima primjene međunarodnog standarda bPPD-a prikazanih na slici 12. pokazala je kako nema značajne razlike u srednjim vrijednostima promjera reakcija zabilježenih na mjestima primjene međunarodnog standarda bPPD-a između skupina P3 i P2. Ipak, iz rezultata je vidljivo kako su srednje vrijednosti promjera navedenih reakcija zabilježene u skupini P3 manje ne samo od onih zabilježenih u skupini P2, već i od onih zabilježenih u skupini P1, na mjestima primjene sve tri otopine međunarodnog standarda bPPD-a. Navedeni rezultati impliciraju kako je tijekom ovog istraživanja propolis umanjio proupalne učinke jednokratno primijenjenog kortizola, ali i općenito inhibirao razvoj reakcije kasne preosjetljivosti. U prilog tome ide i to što je imunohistokemijskim bojenjem na uzorcima kože zamorčića iz skupine P3 utvrđena manja prisutnost istraživanih proupalnih citokina, ne samo u odnosu na onu utvrđenu na uzorcima kože zamorčića iz skupine P2, već i u odnosu na onu utvrđenu na uzorcima kože zamorčića iz skupine P1 (slike 23 – 26), iako nije bilo razlike u količini staničnog infiltrata između skupina P3 i P1 (slika 19). Ovakvi rezultati zabilježeni u skupini P3 vjerojatno su

posljedica propolisom uzrokovane inhibicije aktivacije transkripcijskog faktora NF- κ B uslijed koje je sprječena sinteza i oslobađanje proupalnih citokina (ARAUJO i sur., 2012.). Uz to, prema ZULHENDRI i sur. (2022.) propolis sprječava migraciju neutrofila i makrofaga, najvjerojatnije inhibicijom određenih kemokina odgovornih za njihovu migraciju. Budući da je na uzorcima kože zamorčića iz skupine P3 utvrđeno manje staničnog infiltrata nego na uzorcima kože zamorčića iz skupine P2 (slika 19) možemo pretpostaviti da je navedeni mehanizam barem djelomično odgovoran za sprječavanje povećanja broja leukocita u koži uzrokovanog kortizolom u skupini P3.

Na temelju navedenoga, smatramo kako opisani rezultati analiza provedenih tijekom ovog istraživanja zabilježeni u skupini P3 ukazuju na protuupalno djelovanje vodenog ekstrakta topola tipa propolisa s područja kontinentalne Hrvatske kada se primjenjuje tijekom dužeg vremenskog razdoblja (44 dana). Međutim, budući da vodeni ekstrakti propolisa, kako je tijekom ovog izlaganja već navedeno, sadržavaju višestruko niže koncentracije polifenola od primjerice etanolnih ekstrakata, otvara se mogućnost daljnjih istraživanja pri kojima bi se procijenili protuupalni učinci na drugačiji način pripremljenih i u različitim dozama primijenjenih ekstrakata ove vrste propolisa.

Tijekom ovog istraživanja je u svrhu dodatne procjene učinka kortizola i propolisa na reakciju kasne preosjetljivosti izazvanu primjenom bPPD-a provedeno i termografsko snimanje životinja u pokusu. Termografija je neinvazivna beskontaktna metoda mjerenja i bilježenja raspodjele temperature na površini promatranog tijela u realnom vremenu. Ova metoda temelji se na mjerenju intenziteta infracrvenog zračenja s površine kože promatranog tijela pomoću posebnih kamera koje ga pretvaraju u električne impulse i prikazuju kao skalu boja pri čemu svaka boja predstavlja drugu temperaturu (SZENTKUTI i sur., 2011.; STELLETTA i sur., 2012.). S obzirom na to da je tjelesna temperatura jedan od bitnih pokazatelja zdravlja, ali i nekih fizioloških stanja poput primjerice graviditeta, termografija se sve češće koristi kao pomoćno dijagnostičko sredstvo u humanoj i veterinarskoj medicini. Primjerice, termografija se pokazala kao pouzdana metoda rane dijagnostike bolesti papaka mliječnih krava (BOBIĆ i sur., 2016.), respiratorne bolesti goveda (SCHAEFER i sur., 2007.) i hromosti konja (CETINKAYA i DEMIRUTKU, 2012.) te kao dobra metoda probira (engl. *screening*) za otkrivanje mastitisa (COLAK i sur., 2008.). Toplina je jedan od pet kardinalnih znakova upale, a nastaje zbog povećanog protoka krvi na mjestu infekcije ili ozljede tkiva (GAMULIN i sur., 2002.). S obzirom na to bilo bi za očekivati kako će temperatura na mjestima primjene bPPD-a, tj. na mjestima gdje se razvija kasna preosjetljivost, biti veća u odnosu na temperaturu netretirane zdrave kože. Međutim, tijekom ovog istraživanja niti u jednoj skupini zamorčića

nisu zabilježene razlike između temperature kože na mjestima primjene bPPD-a i temperature netretiranih dijelova kože unatoč tome što su u svih zamorčica iz pokusnih skupina bili jasno vidljivi klinički znakovi reakcije kasne preosjetljivosti na mjestima primjene bPPD-a. Ovakvi rezultati u suprotnosti su s istraživanjem MERKAL i sur. (1973.) tijekom kojeg je termografskom kamerom zabilježeno povišenje temperature od 0,3 - 1,5 °C na mjestima primjene tri različite vrste tuberkulinskih PPD-a u odnosu na netretiranu kožu u goveda senzibiliziranih s *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Navedeni autori također nisu zabilježili povišenje temperature na mjestima primjene tuberkulinskih PPD-a u nesenzibiliziranih goveda. Termografskom kamerom su povišenje temperature na mjestima primjene tuberkulinskog PPD-a u goveda senzibiliziranih s *M. bovis*, soj BCG zabilježili i LEPPER i sur. (1974.). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su kako intenzitet povišenja temperature na mjestu primjene tuberkulinskog PPD-a, kao i debljina kožnog nabora, ovisi o sadržaju i.j. PPD-a u primijenjenoj dozi. Temperatura se najbrže podizala na mjestu primjene doze s najvećim sadržajem i.j. PPD-a gdje je povišenje temperature zabilježeno već 4 sata nakon primjene. Međutim, 16 sati nakon primjene tuberkulinskog PPD-a, povišenje temperature zabilježeno je na svim mjestima primjene. Od 70-ih godina prošlog stoljeća kada su navedena istraživanja provedena, dodatno su poboljšane kvaliteta i performanse termografskih kamera. FIZ i sur. (2015.) ukazali su na mogućnost primjene termografije kao dodatne metode očitavanja rezultata TKT-a u ljudi koja bi upotpunila trenutnu subjektivnu i ne u potpunosti pouzdanu metodu očitavanja rezultata mjerenjem promjera otekline na koži 48 - 72 sata nakon primjene hPPD-a. Navedeni autori proveli su istraživanje tijekom kojeg su uspoređivali rezultate TKT-a dobivene mjerenjem promjera otekline na mjestu primjene hPPD-a s rezultatima TKT-a dobivenim termografskim snimanjem otekline na mjestu primjene hPPD-a u ljudi koji su bili u kontaktu s nekim oboljelim od tuberkuloze. Očitavanje rezultata TKT-a pomoću obje metode obavljeno je 48 sati nakon primjene hPPD-a. U 20 od ukupno 34 osobe koje su sudjelovale u istraživanju utvrđen je pozitivan rezultat, neovisno o metodi očitavanja, dok je u preostalih 14 osoba utvrđen negativan rezultat, također neovisno o metodi očitavanja. Slično istraživanje proveli su JOHNSON i DUNBAR (2008.) na nesenzibiliziranim govedima i govedima senzibiliziranim s *M. bovis* ili *M. avium* kako bi procijenili učinkovitost termografije kao metode očitavanja komparativnog intradermalnog cervikalnog testa. Termografskom kamerom zabilježeno je povišenje temperature na mjestima primjene aPPD i bPPD u svih senzibiliziranih goveda. Daljnom analizom termografskih snimaka načinjenih 72 sata nakon primjene aPPD i bPPD, u 86 % goveda je točno utvrđeno kojom vrstom mikobakterija su senzibilizirana, tj. u goveda senzibiliziranih s *M. bovis* veće povišenje temperature zabilježeno je na mjestu primjene bPPD,

dok je u goveda senzibiliziranih s *M. avium* veće povišenje temperature zabilježeno na mjestu primjene aPPD. Nasuprot tome, na temelju mjerenja kožnog nabora na mjestima primjene aPPD i bPPD točno je utvrđeno kojom vrstom mikobakterija su goveda senzibilizirana u 80 % goveda. Ipak, navedeni autori su zaključili kako su potrebna daljnja istraživanja koja bi pomogla rasvijetliti utjecaj drugih čimbenika, poput primjerice vremenskih uvjeta ili pasmine goveda, na temperaturu površine kože i posljedično na očitavanje rezultata TKT-a u goveda pomoću termografije.

Unatoč svemu navedenom, treba uzeti u obzir kako je uspješnost termografskog snimanja uvjetovana mnogim faktorima vezanim uz vrstu životinje koja se snima, primjerice debljinom, prokrvljenošću i bojom kože, gustoćom i bojom krzna ili dlake, fiziološkom tjelesnom temperaturom i slično, a koji utječu na toplinsko zračenje tijela jedinki te vrste (MOTA-ROJAS, D. i sur., 2022.). Pregledom literature nismo naišli na istraživanja slična ovom koja se bave termografskim snimanjem upalnih procesa u koži zamorčadi, stoga rezultate dobivene tijekom ovog istraživanja ne možemo uspoređivati s rezultatima drugih autora. S obzirom na to smatramo kako su potrebna daljnja sveobuhvatnija istraživanja koja bi pomogla utvrditi mogućnost primjene termografije u ove vrste.

7. ZAKLJUČCI

1. Svakodnevna primjena vodenog ekstrakta topola tipa propolisa s područja kontinentalne Hrvatske tijekom 44 dana nema značajan učinak na tjelesnu masu zamorčića
2. Svakodnevna primjena vodenog ekstrakta topola tipa propolisa s područja kontinentalne Hrvatske tijekom 44 dana sprječava jednokratnim izlaganjem kortizolu uzrokovano povećanje broja neutrofila u krvi, međutim nema značajan učinak na preostale hematološke i biokemijske pokazatelje krvi, kao niti na promjere reakcija nastalih na mjestima primjene bPPD-a u senzibilizirane zamorčadi jednokratno izložene kortizolu
3. Svakodnevna primjena vodenog ekstrakta topola tipa propolisa s područja kontinentalne Hrvatske tijekom 44 dana umanjuje intenzitet reakcije kasne preosjetljivosti u smislu smanjenog oslobađanja proupalnih citokina na mjestima primjene bPPD-a
4. Jednokratna primjena kortizola značajno povećava broj leukocita i broj neutrofila te značajno snižava razinu urea nitrogena, međutim nema značajan učinak na preostale hematološke i biokemijske pokazatelje krvi u senzibilizirane zamorčadi kojoj je primijenjen bPPD
5. Određivanje razina kortizola u slini pokazalo se dobrom i pouzdanom metodom praćenja izloženosti zamorčića stresu tijekom pokusa
6. Jednokratna primjena kortizola 3 sata prije primjene bPPD-a nije pokazala značajan učinak na promjere reakcija nastalih na mjestima primjene bPPD-a u senzibilizirane zamorčadi, iako je pojačala intenzitet reakcije kasne preosjetljivosti u smislu pojačane infiltracije imunskih stanica karakterističnih za kasnu preosjetljivost i povećanog oslobađanja proupalnih citokina na mjestima primjene bPPD-a
7. Termografsko snimanje nije se pokazalo pouzdanom metodom očitavanja reakcija na primjenu međunarodnog standarda bPPD-a u senzibilizirane zamorčadi

8. POPIS LITERATURE

- ABRAHAM, K. A., G. S. BESRA (2018): Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*. 145, 116-133.
- AD'HIAH, A., G. SULAIMAN, M. AL-ZAIDY (2007): Some Immunological Evaluations of Propolis in Albino Male Mice. *J. Fac. Med. Baghdad*. 49, 121-125.
- AGUIAR, S. C., S. M. COTTICA, J. S. BOEING, R. B. SAMENSARI, G. T. SANTOS, J. V. VISENTAINER, L. M. ZEOULA (2014): Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim. Feed Sci. Tech.* 193, 148-154.
- ALANAZI, S., M. ALENZI, J. FEARNLEY, W. HARNETT, D. G. WATSON (2020): Temperate Propolis Has Anti-Inflammatory Effects and Is a Potent Inhibitor of Nitric Oxide Formation in Macrophages. *Metabolites*. 10, 413.
- AL-HARIRI, M. (2019): Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. *J. Family Community Med.* 26, 57-60.
- AMBROSE, C. T. (1970): The essential role of corticosteroids in the induction of the immune response *in vitro*. U: *Hormones and the Immune Response*. (Wolstenholme, G. E. W., J. Knights, ur.), Ciba Foundation, Study Group No 36. Churchill, London, str. 100-125.
- ANDERSEN, P. (1997): Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 45, 115-131.
- ANONIMNO (2019a): European Pharmacopoeia. Tuberculin purified protein derivative, bovine. 9th ed., European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, str. 3863-3864.
- ANONIMNO (2019b): Laboratory diagnostics in guinea pigs. Laboklin; dostupno na: <https://laboklin.com/en/laboratory-diagnostics-in-guinea-pigs/>, posjećeno 15. 4. 2024.
- ANONIMNO (2019c): OIE project to replace International Standard Bovine Tuberculin. World Organisation for Animal Health; dostupno na: <https://bulletin.woah.org/?panorama=4-1-1-isbt-en>, posjećeno 22. 2. 2024.

ANONIMNO (2020): Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2019. godinu. WEB izdanje. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb; dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/12/Ljetopis_Yerabook_2019.pdf; posjećeno 2. 9. 2021.

ANONIMNO (2021): Program iskorjenjivanja i nadziranja tuberkuloze goveda u Republici Hrvatskoj u 2021. godini. Republika Hrvatska, Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb, dostupno na: http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/Zdravlje_zivotinja/tbg_bg_elg/TBC%20Program%202021.pdf; posjećeno 2. 9. 2021.

ANONIMNO (2022a): Blood urea nitrogen (BUN) test, Cleveland Clinic; dostupno na <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/17684-blood-urea-nitrogen-bun-test>, posjećeno 7. 8. 2022.

ANONIMNO (2022b): Hydrocortisone side effects, Drugs.com; dostupno na <https://www.drugs.com/sfx/hydrocortisone-side-effects.html>, posjećeno 7. 8. 2022.

ANONIMNO (2023a): Bovine tuberculosis, World Organisation for Animal Health; dostupno na: <https://www.woah.org/en/disease/bovine-tuberculosis/>, posjećeno 22. 2. 2024.

ANONIMNO (2023b): Global tuberculosis report 2023, 1.2 TB mortality, World Health Organisation; dostupno na: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023/tb-disease-burden/1-2-tb-mortality>, posjećeno 2. 5. 2024.

ANONIMNO (2023c): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. Chapter 3.1.13. Mammalian tuberculosis (infection with Mycobacterium tuberculosis complex) (version adopted in May 2022), World Organisation for Animal Health; dostupno na: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.13_Mammalian_tuberculosis.pdf; posjećeno 16. 1. 2024.

ANONIMNO (2023d): Tuberculosis, World Health Organisation; dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>, posjećeno 2. 5. 2024.

- ANONIMNO (2024a): Bovine tuberculosis European Union Reference Laboratory, Visavet Health Surveillance Centre; dostupno na: <https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/>, posjećeno 17. 3. 2024.
- ANONIMNO (2024b): CombiStats. Computer Software for the Statistical Analysis of Biological Dilution Assay Results. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; dostupno na: <https://www.edqm.eu/en/combistats-tm>, posjećeno 21. 3. 2024.
- ANSORGE, S., D. REINHOLD, U. LENDECKEL (2003): Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 58, 580-589.
- ARANAZ, A., L. DE JUAN, J. BEZOS, J. ALVAREZ, B. ROMERO, F. LOZANO, J. L. PARAMIO, J. LÓPEZ-SÁNCHEZ, A. MATEOS, L. DOMÍNGUEZ (2006): Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37, 593-606.
- ARAUJO, M., S. LIBERIO, R. GUERRA, M. RIBEIRO, F. NASCIMENTO (2012): Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: A brief review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 208-219.
- ARLT, W., P. M. STEWART (2005): Adrenal Corticosteroid Biosynthesis, Metabolism, and Action. *Endocrin. Metab. Clin.* 34, 293-313.
- BAE, Y., S. LEE, S. H. KIM (2011): Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. *Toxicol. Appl. Pharm.* 254, 56-64.
- BARBERIS, I., N. L. BRAGAZZI, L. GALLUZZO, M. MARTINI (2017): The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J. Prev. Med. Hyg.* 58, 9-12.

- BAUER, A., F. TRONCHE, O. WESSELY, C. KELLENDONK, H. M. REICHARDT, P. STEINLEIN, G. SCHÜTZ, H. BEUG (1999): The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* 13, 2996-3002.
- BEHR, M. A., S. GAGNEUX (2011): The Rise and Fall of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. U: *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. (Tibayrenc, M., ur.), Elsevier, London, str. 651-667.
- BÉLARD, E., S. SEMB, M. RUHWALD, A. M. WERLINRUD, B. SOBORG, F. KRIEGER JENSEN, H. THOMSEN, A. BRYLOV, M. LUND HETLAND, I. NORDGAARD-LASSEN, P. RAVN (2011): Prednisolone treatment affects the performance of the QuantiFERON gold in-tube test and the tuberculin skin test in patients with autoimmune disorders screened for latent tuberculosis infection. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2340–2349.
- BETANCOURT, N., L. GARCÍA-CONTRERAS, T. SÁNCHEZ (2015): Propolis in Dogs: Clinical Experiences and Perspectives (A Brief Review). *Open J. Vet. Med.* 5, 11-17.
- BEZOS, J., C. CASAL, B. ROMERO, B. SCHROEDER, R. HARDEGGER, A. J. RAEBER, L. LÓPEZ, P. RUEDA, L. DOMÍNGUEZ (2014a): Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97, 44-52.
- BEZOS, J., J. ALVAREZ, B. ROMERO, L. DE JUAN, L. DOMÍNGUEZ (2014b): Bovine tuberculosis: historical perspective. *Res. Vet. Sci.* 97, 3-4.
- BLACK, C. A. (1999): Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol. Online J.* 5, 7.
- BOBIĆ, T., P. MIJIĆ, M. GREGIĆ, M. BABAN, V. GANTNER (2016): Application of thermovision camera in the early detection of hoof diseases in dairy cows. *Krmiva.* 58, 55-59.
- BÖDDINGHAUS, B., T. ROGALL, T. FLOHR, H. BLÖCKER, E. C. BÖTTGER (1990): Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1751-1759.

- BOGDANOV, S. (2016). Propolis: Origine, Production, Composition. U: The Propolis book. (Bogdanov, S., ur.), Bee Product science, str. 2-20.
- BORSUK, S., J. NEWCOMBE, T. A. MENDUM, O. A. DELLAGOSTIN, J. MCFADDEN (2009): Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. Tuberculosis (Edinb.). 89, 423-430.
- BOTHAMLEY, G. H., J. M. GRANGE (1991): The Koch phenomenon and delayed hypersensitivity: 1891-1991. Tubercle. 72, 7-11.
- BOUGHTON, B., W. G. SPECTOR (1963): Histology of the tuberculin reaction in guinea-pigs. J. Pathol. Bacterio. 85, 371-381.
- BROŽIĆ, D., G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. MAŠEK, L. RADIN, J. ALADROVIĆ, K. MATANOVIĆ, F. BOŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, B. RADIĆ, J. ŠURAN (2016): „Intramamarna formulacija propolisa za prevenciju i tretman mastitisa kod mliječnih preživača“, prvi projekt suradnje Veterinarskoga fakulteta s gospodarstvom financiran iz strukturnih fondova Europske unije. Hrvatski veterinarski vjesnik. 24, 56-63.
- BURDOCK, G. A. (1998): Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol. 6, 347-363.
- BUSILLO, J. M., J. A. CIDLOWSKI (2013): The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. Trends Endocrinol. Metab. 24, 109-119.
- BUZIC, I., V. GIUFFRA (2020): The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review. J. Prev. Med. Hyg. 61, E3-E8.
- CAIN, D. W., J. A. CIDLOWSKI (2017): Immune regulation by glucocorticoids. Nat. Rev. Immunol. 17, 233-247.
- CANO, R. L. E., H. D. E. LOPERA (2013): Introduction to T and B lymphocytes. U: Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. (Anaya, J. M., Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R. A. Levy, R. Cervera, ur.), El Rosario University Press, Bogota (Colombia), str. 77-95.

- CASSIDY, J. P. (2006): The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol.* 112, 151-161.
- CECERE, B. G. O., A. S. DA SILVA, V. MOLOSSE, D. F. ALBA, K. W. LEAL, G. DA ROSA, W. A. B. PEREIRA, A. D. DA SILVA, M. R. C. SCHETINGER, A. P. KEMPKA, A. NUNES, M. MARASCHIN, D. N. ARAUJO, G. L. DEOLINDO, M. VEDOVATTO (2021): Addition of propolis to milk improves lactating lamb's growth: effect on antimicrobial, antioxidant and immune responses in animals. *Small Rumin. Res.* 194, 106265.
- CERÓN, J. J., M. D. CONTRERAS-AGUILAR, D. ESCRIBANO, S. MARTINEZ-MIRO, M. J. LOPEZ-MARTINEZ, A. ORTIN-BUSTILLO, L. FRANCO-MARTINEZ, C. P. RUBIO, A. MUNOZ-PRIETO, A. TVARIJONAVICIUTE, M. LOPEZ-ARJONA, S. MARTINEZ-SUBIELA, F. TECLES (2022): Basics for the potential use of saliva to evaluate stress, inflammation, immune system, and redox homeostasis in pigs. *BMC Vet. Res.* 18, 81.
- CETINKAYA, M. A., A. DEMIRUTKU (2012): Thermography in the assessment of equine lameness. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36, 43-48.
- CHIARADIA, L., C. LEFEBVRE, J. PARRA, J. MARCOUX, O. BURLET-SCHILTZ, G. ETIENNE, M. TROPIS, M. DAFFÉ (2017): Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* 7, 12807.
- CHMELIKOVA, E., P. BOLECHOVA, H. CHALOUPKOVA, I. SVOBODOVA, M. JOVIČIĆ, M. SEDMIKOVA (2020): Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: a review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 72, 106428.
- CIZZA, G., K. I. ROTHER (2012): Cortisol binding globulin: more than just a carrier? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 77-80.
- CLEMONS, D. J., J. L. SEEMAN (2018): Hematology. U: The Laboratory Guinea Pig (2nd edition). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, str. 19-21.
- COAD, M., D. CLIFFORD, S. G. RHODES, R. G. HEWINSON, H. M. VORDERMEIER, A. O. WHELAN (2010): Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally

- infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. Vet. Res. 41, 14.
- COLAK, A., B. POLAT, Z. OKUMUS, M. KAYA, L. E. YANMAZ, A. HAYIRLI (2008): Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. J. Dairy Sci. 91, 4244-4248.
- COONEY, R., J. KAZDA, J. QUINN, B. R. COOK, K. MÜLLER, M. MONAGHAN (1997): Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculins. Irish Vet. J. 50, 370-373.
- COUTINHO, A. E., K. E. CHAPMAN (2011): The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. Mol. Cell Endocrinol. 335, 2-13.
- CRUZ SÁNCHEZ, T., P. GARCÍA, C. ZAMORA, M. MARTÍNEZ, V. VALENCIA, A. OROZCO (2014): Use of Propolis for Topical Treatment of Dermatophytosis in Dog. Open J. Vet. Med. 4, 239-245.
- CRUZ-TOPETE, D., J. A. CIDLOWSKI (2015): One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. Neuroimmunomodulat. 22, 20-32.
- CUESTA, A., A. RODRÍGUEZ, M. A. ESTEBAN, J. MESEGUER (2005): *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. Fish Shellfish Immunol. 18, 71-80.
- CVETNIĆ, Ž. (2013): Infekcije vrstama roda *Mycobacterium*. U: Bakterijske i gljivične zoonoze. (Herak Perković, V., ur.), Medicinska naklada i Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, str. 244-264.
- CZARNOBILSKA, E., K. OBTUŁOWICZ, K. WSOŁEK (2007): Type IV of hypersensitivity and its subtypes. Przegl. Lek. 64, 506-508.
- DANIEL, T. M. (2006): The history of tuberculosis. Resp. Med. 100, 1862-1870.
- DANNENBERG, A. M. (1991): Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immunol. Today. 12, 228-233.

- DAY, M. D., R. D. SCHULTZ (2013a): Biologija T-limfocita. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 83-96.
- DAY, M. D., R. D. SCHULTZ (2013b): Mehanizmi preosjetljivosti. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 120-130.
- DE ALMEIDA, E. C. (2002): Evaluation of the anti-inflammatory activity of propolis extracts. Magistarski rad, Rio Claro Institute of Biosciences, Rio Claro, Brazil.
- DE GROOT, A. C. (2013): Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*. 24, 263-282.
- DE LA RUA-DOMENECH, R., A. T. GOODCHILD, H. M. VORDERMEIER, R. G. HEWINSON, K. H. CHRISTIANSEN, R. S. CLIFTON-HADLEY (2006): *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190-210.
- DEY, B., W. R. BISHAI (2014): Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell. *Semin. Immunol.* 26, 486-496.
- DHABHAR, F. S. (2002): Stress-induced augmentation of immune function: The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immun.* 16, 785-798.
- DHABHAR, F. S., A. R. SATOSKAR, H. BLUETHMANN, B. S. MCEWEN (2000): Stress-induced enhancement of skin immune function: a role for γ interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 2846-2851.
- DHABHAR, F. S., B. S. MCEWEN (1996): Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 156, 2608–2615.
- DHABHAR, F. S., K. VISWANATHAN (2005): Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *Am. J. Physiol. - Reg. I.* 289, 738-744.
- DHABHAR, F. S., W. B. MALARKEY, E. NERI, B. S. MCEWEN (2012): Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of

- three hormones - Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*. 37, 1345-1368.
- DHEDA, K., S. K. SCHWANDER, B. ZHU, R. N. VAN ZYL-SMIT, Y. ZHANG (2010): The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology*. 15, 433-450.
- DIAZ-JIMENEZ, D., J. P. KOLB, J. A. CIDLOWSKI (2021): Glucocorticoids as Regulators of Macrophage-Mediated Tissue Homeostasis. *Front. Immunol.* 12, 669891.
- DIMOV, V., N. IVANOVSKA, N. MANOLOVA, V. BANKOVA, N. NIKOLOV, S. POPOV (1991): Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*. 22, 155-162.
- DISPENZA, M. C. (2019): Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 40, 470-473.
- DOHERTY, M. L., H. F. BASSETT, P. J. QUINN, W. C. DAVIS, M. L. MONAGHAN (1995): Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet Res.* 56, 1300-1306.
- DRAGANOVA-FILIPOVA, M., M. NIKOLOVA, A. MICHOVA, L. PEYCHEV, V. SARAFIAN (2010): A Pilot Study on the Immunomodulatory Effect of Bulgarian Propolis. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 24, 119-124.
- DUIGNAN, A., K. KENNY, D. BAKKER, M. GOOD (2019): Tuberculin PPD Potency Assays in Naturally Infected Tuberculous Cattle as a Quality Control Measure in the Irish Bovine Tuberculosis Eradication Programme. *Front. Vet. Sci.* 6, 328.
- DULBERGER, C. L., E. J. RUBIN, C. C. BOUTTE (2020): The mycobacterial cell envelope - a moving target. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 47-59.
- FITRIA, L., S. LESTARI, A. N. ISTIQOMAH, N. P. WULANDARI, A. S. WARDANI (2021): Hematology profile of guinea pigs [*Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758)] based on sex and age. *Proceedings of the 7th International Conference on Biological Science (ICBS 2021)*, 14. - 15. listopada, Yogyakarta, Indonezija.
- FIZ, J. A., M. LOZANO, E. MONTE-MORENO, A. GONZALEZ-MARTINEZ, M. FAUNDEZ-ZANUY, C. BECKER, L. PONS-RODRIGUEZ, J. RUIZ MANZANO

- (2015): Tuberculin reaction measured by infrared thermography. *Comput. Methods Programs Biomed.* 122, 199-206.
- GAMULIN, S., M. MARUŠIĆ, Z. KOVAČ (2002): Upale. U: *Patofiziologija*. (Gamulin, S. M. Marušić, Z. kovač, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 471-498.
- GARCÍA, J. S., M. M. BIGI, L. I. KLEPP, F. C. BLANCO, F. BIGI (2020): Does *Mycobacterium bovis* persist in cattle in a non-replicative latent state as *Mycobacterium tuberculosis* in human beings? *Vet. Microbiol.* 247, 108758.
- GARRIS, D. R. (1979): Diurnal fluctuation of plasma cortisol levels in the guinea pig. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*. 90, 692-695.
- GIRGIN, G., T. BAYDAR, M. LEDOCHOWSKI, H. SCHENNACH, D. N. BOLUKBASI, K. SORKUN, B. SALIH, G. SAHIN, D. FUCHS (2009): Immunomodulatory effects of Turkish propolis: changes in neopterin release and tryptophan degradation. *Immunobiology*. 214, 129-134.
- GOOD, M., A. DUIGNAN (2011): Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Vet. Med. Int.* 2011, 410470.
- GOOD, M., D. BAKKER, A. DUIGNAN, D. M. COLLINS (2018): The History of In Vivo Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a "One Health" Issue. *Front. Vet. Sci.* 5, 59.
- GRADMANN, C. (2006): Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes Infect.* 8, 294-301.
- GRANGE, J. M., R. W. DAVEY (1990): Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. Roy. Soc. Med.* 83, 159-160.
- GREGURIĆ GRAČNER, G., Ž. PAVIČIĆ, S. ŽUŽUL, A. DOVČ, N. LONČARIĆ, J. GRIZELJ, M. LIPAR, D. GRAČNER (2018): Monitoring saliva cortisol level in dairy goats during April, May and July in a semi-intensive rearing system. *Vet. Stanica.* 49, 179-185.
- HAAGSMA, J. (1986): Potency testing of bovine tuberculins. *Dev. Biol. Stand.* 58, 689-694.

- HANIEH, H., V. I. HAIRUL ISLAM, S. SARAVANAN, M. CHELLAPPANDIAN, K. RAGUL, A. DURGA, K. VENUGOPAL, V. SENTHILKUMAR, P. SENTHILKUMAR, K. THIRUGNANASAMBANTHAM (2017): Pinocembrin, a novel histidine decarboxylase inhibitor with anti-allergic potential in *in vitro*. Eur. J. Pharmacol. 814, 178-186.
- HAQUE, S. N., K. R. MIFSUD, E. M. PRICE, J. M. H. M. REUL (2021): Responding to Stress: Genomic and Nongenomic Actions of Corticosteroid Receptors in the Brain. U: Stress: Genetics, Epigenetics and Genomics. (Fink, G., ur.), Academic Press, str. 215-227.
- HASLØV, K., A. ANDERSEN, S. NAGAI, A. GOTTSCHAU, T. SØRENSEN, P. ANDERSEN (1995): Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 63, 804-810.
- HAYRIYE, A. L. P. (2018): Effects of Propolis on Immune System. Anadolu J. of AARI. 28, 99-104.
- HEROLD, M. J., K. G. MCPHERSON, H. M. REICHARDT (2006): Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. Cell. Mol. Life Sci. 63, 60-72.
- HERSHKOVITZ, I., H. D. DONOGHUE, D. E. MINNIKIN, G. S. BESRA, O. Y. LEE, A. M. GERNAEY, E. GALILI, V. ESHED, C. L. GREENBLATT, E. LEMMA, G. K. BARGAL, M. SPIGELMAN (2008): Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One. 3, e3426.
- HILLIER, S. G. (2007): Diamonds are forever: the cortisone legacy. J. Endocrinol. 195 (1), 1-6.
- JENKINS, A. O., E. GORMLEY, N. GCEBE, G. T. FOSGATE, A. CONAN, C. AAGAARD, A. L. MICHEL, V. P. M. G. RUTTEN (2018): Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria. Prev. Vet. Med. 152, 16-22.
- JOHNSON, S. R., M. R. DUNBAR (2008): Use of infrared thermography as an alternative method to evaluate the comparative cervical test (CCT) in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis* or *Mycobacterium avium*. Proceedings of 112th Annual Meeting

- of the United States Animal Health Association, 26-29 October, Greensboro, North Carolina, United States, str. 101-102.
- JUNG, W. K., D.Y. LEE, Y. H. CHOI, S. S. YEA, I. CHOI, S. G. PARK, S. K. SEO, S. W. LEE, C. M. LEE, S. K. KIM, Y. J. JEON, I. W. CHOI (2008): Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. *Life Sci.* 82, 797-805.
- JURČEV-SAVIČEVIĆ, A., Đ. VIDIĆ, K. MIŠE, R. MULIĆ (2013): I u trećem tisućljeću sa starim poznanikom: problemi u tumačenju rezultata tuberkulinskog testa. *Med. Jad.* 43, 119-125.
- JURIKOVA, T., J. MLČEK, J. SOCHOR, A. HEGEDUSOVA (2015): Polyphenols and their Mechanism of Action in Allergic Immune Response. *Glob. J. Allergy.* 1, 37-39.
- KABAKCI, D. (2022): An Overview on the Effects of Propolis Administration in Different Branches of Livestock Production. *Bee Studies.* 14, 41-46.
- KABAKCI, D. (2022): An Overview on the Effects of Propolis Administration in Different Branches of Livestock Production. *Bee Studies.* 14, 41-46.
- KANEENE, J. B., D. PFEIFFER (2006): Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. U: *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 2nd edition. (Thoen, C. O., J. H. Steele, M. J. Gilsdorf, ur.), Blackwell Publishing, Des Moines, Iowa, str. 34–48.
- KATALINIĆ, V., S. RADIĆ, D. ROPAC, R. MULIĆ, A. KATALINIĆ (2004): Antioksidacijski kapacitet dalmatinskog propolisa [Antioxidative activity of propolis from Dalmatia (Croatia)]. *Acta Med. Croatica.* 58, 373-376.
- KAWAI, M., T. HIRANO, S. HIGA, J. ARIMITSU, M. MARUTA, Y. KUWAHARA, T. OHKAWARA, K. HAGIHARA, T. YAMADORI, Y. SHIMA, A. OGATA, I. KAWASE, T. TANAKA (2007): Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol. Int.* 56, 113-123.
- KEIGHTLEY, M. C., P. J. FULLER (1995): Cortisol resistance and the guinea pig glucocorticoid receptor. *Steroids.* 60, 87-92.

- KHAYYAL, M. T., M. A. EL-GHAZALY, A. S. EL-KHATIB (1993): Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drug. Exp. Clin. Res.* 19, 197-203.
- KHOJASTEH SHALMANY, S., M. SHIVAZAD (2006): The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. *Int. J. Poult. Sci.* 5, 84-88.
- KIMATA, M., M. SHICHIJO, T. MIURA, I. SERIZAWA, N. INAGAKI, H. NAGAI (2000): Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin. Exp. Allergy.* 30, 501-508.
- KING, D. J., J. BRUNTON, R. D. BARR (1988): The influence of corticosteroids on human erythropoiesis. An *in vivo* study. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 10, 313-315.
- KITAMURA, H. (2019): Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models. *Molecules.* 24, 4394.
- KOBAYASHI, K., K. KANEDA, T. KASAMA (2001): Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Techniq.* 53, 241-245.
- KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, Y. U. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J. Ethnopharmacol.* 64, 235–240.
- LANGE, C., M. SESTER (2012): TB or not TB: The role of immunodiagnosis. *Eur. J. Immunol.* 42, 2840-2843.
- LEPPER, A. W.D., M. R. MEHARRY, P. M. OUTTERIDGE (1974): Measurement of infra-red radiation from tuberculin skin test sites in cattle. *Aust. Vet. J.* 50, 192-198.
- LI, Y. J., H. Z. XUAN, Q. Y. SHOU, Z. G. ZHAN, X. LU, F. L. HU (2012): Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 31, 157-165.
- LIBERMAN, A. C., M. L. BUDZIŃSKI, C. SOKN, R. P. GOBBINI, A. STEININGER, E. ARZT (2018): Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 9, 235.

- LOMBARD, J. E., E. A. PATTON, S. N. GIBBONS-BURGENER, R. F. KLOS, J. L. TANSKERSTEN, B. W. CARLSON, S. J. KELLER, D. J. PRITSCHET, S. ROLLO, T. V. DUTCHER, C. A. YOUNG, W. C. HENCH, T. C. THACKER, C. PEREA, A. D. LEHMKUHL, S. ROBBE-AUSTERMAN (2021): Human-to-Cattle *Mycobacterium tuberculosis* Complex Transmission in the United States. *Front. Vet. Sci.* 8, 691192.
- LOZINA, L. A., M. E. PEICHOTO, S. I. BOEHRINGER, P. KOSCINCZUK, G. E. GRANERO, O. C. ACOSTA (2010): Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 1359-1366.
- LUCIANO, S. A., A. ROESS (2020): Human zoonotic tuberculosis and livestock exposure in low- and middle-income countries: A systematic review identifying challenges in laboratory diagnosis. *Zoonoses Public Hlth.* 67, 97-111.
- LYADOVA, I. (2012): Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression. U: Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of *Mycobacterium Tuberculosis* Pathogenicity. (Cardona, P. J., ur.), InTech, Rijeka, str. 19-42.
- MACHADO, G. T. P., M. B. VELEIRINHO, L. MAZZARINO, L. C. P. M. FILHO, M. MARASCHIN, R. L. A. CERRI, S. KUHNEN (2019): Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: *in vitro* studies on antimicrobial and cytotoxic activities. *Can. J. Anim. Sci.* 99, 713-723.
- MAHMOUD, U. T., M. A. ABDEL-RAHMAN, M. H. A. DARWISH (2013): The Effect of Chinese Propolis Supplementation on Ross Broiler Performance and Carcass Characteristics. *J. Adv. Vet. Res.* 3, 154-160.
- MANI, F., H. C. DAMASCENO, E. L. NOVELLI, E. A. MARTINS, J. M. SFORCIN (2006): Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.* 105, 95-98.
- MARQUEZ, N., R. SANCHO, A. MACHO, M. A. CALZADO, B. L. FIEBICH, E. MUÑOZ (2004): Caffeic acid phenethyl Ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-B transcription factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 993-1001.

- MARTINO, A. (2008): Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. J. Bioscience. 33, 137-144.
- MARWA, K., N. P. KONDAMUDI (2021): Type IV Hypersensitivity Reaction. U: StatPearls (WEB izdanje - ažurirano 26. 4. 2021.). StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida; dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562228/>; posjećeno 11. 5. 2021.
- MAYER-BARBER, K. D., D. L. BARBER (2015): Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. CSH Perspect. Med. 5, a018424.
- MCKAY, L. I., J. A. CIDLOWSKI (2003): Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. U: Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. (Kufe, D. W., R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast Jr., T. S. Gansler, J. F. Holland, E. Frei, ur.), B. C. Decker, Hamilton (Ontario); dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13780/>; posjećeno 15. 3. 2021.
- MIYATAKA, H., M. NISHIKI, H. MATSUMOTO, T. FUJIMOTO, M. MATSUKA, A. ISOBE, T. SATOH (1998): Evaluation of propolis (II): Effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalin A. Biol. Pharm. Bull. 21, 723-729.
- MOHAMED, A. M. (2017): Tuberculin Skin Test for Control of Bovine Tuberculosis: Limitation History, Current Challenges and Future Opportunities. J. Microbiol. Exp. 4, 00118.
- MOHAMED, W. A., T. ISMAIL, S. FAROUK (2016): The ameliorative potential of ethanolic extract of propolis on hematotoxicity and structural neuronal damage in hyperthermia-exposed rats. Iran. J. Basic Med. Sci. 19, 875-882.
- MONAGHAN, M. L., M. L. DOHERTY, J. D. COLLINS, J. F. KAZDA, P. J. QUINN (1994): The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40, 111-124.
- MORSY, A., Y. A. SOLTAN, H. M. EL-ZAIAT, S. M. ALCENAR, A. L. ABDALLA (2021): Bee propolis extract as a phytogetic feed additive to enhance diet digestibility, rumen microbial biosynthesis, mitigating methane formation and health status of late pregnant ewes. Anim. Feed Sci. and Technol. 273, 114834.

- MOTA-ROJAS, D., A. M. F. PEREIRA, J. MARTÍNEZ-BURNES, A. DOMÍNGUEZ-OLIVA, P. MORA-MEDINA, A. CASAS-ALVARADO, J. RIOS-SANDOVAL, A. DE MIRA GERALDO, D. WANG (2022): Thermal Imaging to Assess the Health Status in Wildlife Animals under Human Care: Limitations and Perspectives. *Animals (Basel)*. 12, 3558.
- MÜLLER, B., S. DÜRR, S. ALONSO, J. HATTENDORF, C. J. M. LAISSE, S. D. C. PARSONS, P. D. VAN HELDEN, J. ZINSSTAG (2013): Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 899-908.
- NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Porodica Mycobacteriaceae. U: Veterinarska mikrobiologija. Specijalna bakteriologija i mikologija. (Hajsig, D., ur.), Veterinarski fakultet i Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, str. 226-235.
- NAKAMURA, R., R. NAKAMURA, K. WATANABE, K. OKA, S. OHTA, S. MISHIMA, R. TESHIMA (2010): Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1107-1112.
- NAMBIAR, R., E. ROHMAWATY, L. LISMAYANTI (2015): Propolis as an Anti-allergy Based on Decrease in Total Eosinophil Count in Rat Models. *Althea Med. J.* 2, 208-212.
- NATARAJAN, K., S. SINGH, T. R. BURKE JR., D. GRUNBERGER, B. B. AGGARWAL (1996): Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9090-9095.
- NCUBE, P., B. BAGHERI, W. J. GOOSEN, M. A. MILLER, S. L. SAMPSON (2022): Evidence, Challenges, and Knowledge Gaps Regarding Latent Tuberculosis in Animals. *Microorganisms.* 10, 1845.
- NEILL, S. D., J. M. POLLOCK, D. B. BRYSON, J. HANNA (1994): Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40, 41-52.
- NEMETH, M., E. PSCHERNIG, B. WALLNER, E. MILLESI (2016): Non-invasive cortisol measurements as indicators of physiological stress responses in guinea pigs. *PeerJ.* 4, e1590.

- NORTHROP, J. P., G. R. CRABTREE, P. S. MATTILA (1992): Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *J. Exp. Med.* 175, 1235-1245.
- OLNES, M. J., Y. KOTLIAROV, A. BIANCOTTO, F. CHEUNG, J. CHEN, R. SHI, H. ZHOU, E. WANG, J. S. TSANG, R. NUSSENBLATT, CHI CONSORTIUM (2016): Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immunome. *Sci. Rep.* 6, 25215.
- ORSATTI, C. L., F. MISSIMA, A. C. PAGLIARONE, J. M. SFORCIN (2010a): Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J. Ethnopharmacol.* 129, 314-318.
- ORSATTI, C. L., F. MISSIMA, A. C. PAGLIARONE, T. F. BACHIEGA, M. C. BÚFALO, J. P. ARAÚJO, J. M. SFORCIN (2010b): Propolis immunomodulatory action *in vivo* on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother. Res.* 24, 1141-1146.
- ORSATTI, C. L., J. M. SFORCIN (2012): Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. *Nat. Prod. Res.* 26, 446-453.
- ORSI, R. O., J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI, J. C. GOMES (2005a): Effect of propolis extract on guinea pig lung mast cell. *J. Venom. Anim. Toxins.* 11, 76-83.
- ORSI, R. O., J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI, V. BANKOVA (2005b): Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *Int. Immunopharmacol.* 5, 359-368.
- ORSI, R. O., S. R. C. FUNARI, A. M. V. C. SOARES, S. A. CALVI, S. L. OLIVEIRA, J. M. SFORCIN, V. BANKOVA (2000): Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins.* 6, 205-219.
- ORŠOLIĆ, N., I. BAŠIĆ (2008): Propolis and plant flavonoids in human allergies and inflammations. U: Scientific evidence of the use of propolis in ehtnomedicine. (Oršolić, N., I. Bašić, ur.), Transworld Research Network, Kerala, str. 337-376.

- ORŠOLIĆ, N., S. TERZIĆ, L. ŠVER (2005): Polyphenolic compounds from propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumour cells. *Food Agr. Immunol.* 16, 165-179.
- OTA, C., C. UNTERKIRCHER, V. FANTINATO, M. T. SHIMIZU (2001): Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses.* 44, 375-378.
- OZKOK, D., K. M. ISCAN, S. SILICI (2013): Effects of dietary propolis supplementation on performance and egg quality in laying hens. *J. Anim. Vet. Adv.* 12, 269-275.
- ÖZSEZEN, B., S. KARAKAYA (2022): Propolis and the immune system. U: *Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries.* (Boyacioglu, D., ur.), Academic Press, str. 115-137.
- PAGLIARONE, A. C., C. L. ORSATTI, M. C. BÚFALO, F. MISSIMA, T. F. BACHIEGA, J. P. ARAÚJO JR., J. M. SFORCIN (2009a): Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. *Int. Immunopharmacol.* 9, 1352–1356.
- PAGLIARONE, A. C., F. MISSIMA, C. L. ORSATTI, T. F. BACHIEGA, J. M. SFORCIN (2009b): Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 125, 230-233.
- PALMER, M. V. (2007): Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr. Top. Microbiol.* 315, 195-215.
- PANDEY, K. B., S. I. RIZVI (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270-278.
- PARK, S. G., D. Y. LEE, S. K. SEO, S. W. LEE, S. K. KIM, W. K. JUNG, M. S. KANG, Y. H. CHOI, S. S. YEA, I. CHOI, I. W. CHOI (2008): Evaluation of anti-allergic properties of caffeic acid phenethyl ester in a murine model of systemic anaphylaxis. *Toxicol. Appl. Pharm.* 226, 22-29.
- PARLANE, N. A., B. M. BUDDLE (2015): Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Curr. Clin. Micro. Rpt.* 2, 44-53.

- PERAK JUNAKOVIĆ, E. (2023): Određivanje biodostupnosti odabranih polifenolnih sastavnica propolisa u uvjetima *in vitro* simulirane probave. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb, Republika Hrvatska.
- PHAM-HUY, L. A., H. HE, C. PHAM-HUY (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89-96.
- PHILLIPS, C. J., C. R. FOSTER, P. A. MORRIS, R. TEVERSON (2003): The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74, 1-15.
- PICHLER, W. J. (2003): Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann. Intern. Med.* 139, 683-693.
- PLATT, J. L., B. W. GRANT, A. A. EDDY, A. F. MICHAEL (1983): Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 158, 1227-1242.
- POLLOCK, J. M., S. D. NEILL (2002): *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163, 115-127.
- POPOIU, S., A. M. TEODORU, N. LEVANDOVSKI, C. COMAN (2021): Hematological and biochemical dynamics of rabbits and guinea pigs used for scientific purposes at Cantacuzino Institute, Bucharest. *Rev. Rom. Med. Vet.* 31, 69-80.
- POULTER, L. W., G. J. SEYMOUR, O. DUKE, G. JANOSSY, G. PANAYI (1982): Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell. Immunol.* 74, 358-369.
- PRODINGER, W. M., A. INDRA, O. K. KOKSALAN, Z. KILICASLAN, E. RICHTER (2014): *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1501-1513.
- QUESENBERRY, K. E., T. M. DONNELLY, C. MANS (2012): Biology, Husbandry, and Clinical Techniques of Guinea Pigs and Chinchillas. U: *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery.* (Quesenberry, K. E., J. W. Carpenter, ur.), Elsevier, Amsterdam, str. 279-294.
- RADUNZ, B. L., A. W. LEPPER (1985): Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Aust. Vet. J.* 62, 191-194.

- RAMAMOORTHY, S., J. A. CIDLOWSKI (2016): Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 42, 15-31.
- RAMANUJAM, H., K. PALANIYANDI (2023): Bovine tuberculosis in India: The need for One Health approach and the way forward. *One Health.* 16, 100495.
- REDDY, D., Y. MA, S. LAKSHMINARAYANAN, S. SAHU, L. F. WHITE, A. RESHMA, G. ROY, P. SALGAME, S. KNUDSEN, C. CINTRON, J. J. ELLNER, C. R. HORSBURGH JR, S. SARKAR, N. S. HOCHBERG (2021): Severe undernutrition in children affects tuberculin skin test performance in Southern India. *PLoS One.* 16:e0250304.
- REIS, J. H. O., G. A. BARRETO, J. C. CERQUEIRA, J. P. D. ANJOS, L. N. ANDRADE, F. F. PADILHA, J. I. DRUZIAN, B. A. S. MACHADO (2019): Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS One.* 14, e0219063.
- RI, J. H., G. H. KANG, S. H. RA (2018): Experimental study on the effect of Propolis injection Concentration to Anaphylaxis Shock. *Indian J. Allergy Asthma Immunol.* 32, 24-27.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, S., N. H. SMITH, M. B. BONIOTTI, A. ARANAZ (2014): Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97, 5-19.
- RÖLTGEN, K., G. PLUSCHKE, J. S. SPENCER, P. J. BRENNAN, C. AVANZI (2020): The immunology of other mycobacteria: *M. ulcerans*, *M. leprae*. *Semin. Immunopathol.* 42, 333-353.
- ROTHSCHILD, B. M., L. D. MARTIN, G. LEV, H. BERCOVIER, G. K. BAR-GAL, C. GREENBLATT, H. DONOGHUE, M. SPIGELMAN, D. BRITTAIN (2001): *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin. Infect. Dis.* 33, 305-311.
- SADARMAN, S., E. ERWAN, A. IRAWAN, M. M. SHOLIKIN, R. SOLFAINE, R. P. HARAHAAP, A. C. IRAWAN, A. SOFYAN, N. NAHROWI, A. JAYANEGARA

- (2021): Propolis supplementation affects performance, intestinal morphology, and bacterial population of broiler chickens. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 51, 477-487.
- SAINT-MEZARD, P., C. CHAVAGNAC, S. BOSSET, M. IONESCU, E. PEYRON, D. KAISERLIAN, J. F. NICOLAS, F. BERARD (2003): Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions *in vivo*. *J. Immunol.* 171, 4073-4080.
- SANTOS, L. M., M. S. FONESCA, A. R. SOKOLONSKI, K. R. DEEGAN, R. P. ARAUJO, M. A. UMSZA-GUEZ, J. D. BARBOSA, R. D. PORTELA, B. A. MACHADO (2019): Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J. Sci. Food Agric.* 100, 1369-1382.
- SARRAZIN, H., K. A. WILKINSON, J. ANDERSSON, M. X. RANGAKA, L. RADLER, K. VAN VEEN, C. LANGE, R. J. WILKINSON (2009): Association between Tuberculin Skin Test Reactivity, the Memory CD4 Cell Subset, and Circulating FoxP3-Expressing Cells in HIV-Infected Persons. *J. Infect. Dis.* 199, 702-710.
- SCHAEFER, A. L., N. J. COOK, J. S. CHURCH, J. BASARAB, B. PERRY, C. MILLER, A. K. TONG (2007): The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res. Vet. Sci.* 83, 376-384.
- SHELLER, S., G. GAZDA, G. PIETZ, J. GABRYS, J. SZUMLAS, L. ECKERT, J. SHANI (1988): The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharmacol. Res. Commun.* 20, 323-328.
- SHELLER, S., S. DWORNICZAK, K. WALDEMAR-KLIMMEK, M. RAJCA, A. TOMCZYK, J. SHANI (1999): Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 54, 549-553.
- SCHNITZLER, P., A. NEUNER, S. NOLKEMPER, C. ZUNDEL, H. NOWACK, K. H. SENSCH, J. REICHLING (2010): Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother. Res.* 24, 20-28.
- SFORCIN, J. M. (2007): Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1-14.

- SFORCIN, J. M., R. KANENO, S. R. C. FUNARI (2002): Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins*. 8, 1-6.
- SHARMA, S. K., V. UPADHYAY (2020): Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian J. Med. Res.* 152, 185-226.
- SHIMBA, A., K. IKUTA (2020): Immune-enhancing effects of glucocorticoids in response to day–night cycles and stress. *Int. Immunol.* 32, 703-708 .
- SHULMAN, S. T. (2017): Clemens von Pirquet: A Remarkable Life and Career. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 6, 376-379.
- SICHEWO, P.R., T. M. HLOKWE, E. M. C. ETTER, A. L. MICHEL (2020): Tracing cross species transmission of *Mycobacterium bovis* at the wildlife/livestock interface in South Africa. *BMC Microbiol.* 20, 49.
- SIERRA-GALICIA, M. I., R. RODRÍGUEZ-DE LARA, J. F. ORZUNA-ORZUNA, A. LARA-BUENO, J. G. GARCÍA-MUÑIZ, M. FALLAS-LÓPEZ, P. A. HERNÁNDEZ-GARCÍA (2022): Supplying Bee Pollen and Propolis to Growing Rabbits: Effects on Growth Performance, Blood Metabolites, and Meat Quality. *Life (Basel)*. 12, 1987.
- SINANOVIĆ, A., M. JAŠIĆ, E. KISELJAKOVIĆ, D. ŠUBARIĆ, S. SELMANOVIĆ (2020): Upotreba apiterapeutskih pripravaka u ublažavanju posljedica stresa i depresije. Zbornik sažetaka i radova sa petog kongresa o pčelarstvu i pčelinjim proizvodima - sa međunarodnim učešćem - PČELARSTVO I PČELINJI PROIZVODI, 20. – 21. studenoga, Tuzla, Bosna i Hercegovina, str. 46-47.
- SINHA, P., A. GUPTA, P. PRAKASH, S. ANUPURBA, R. TRIPATHI, G. N. SRIVASTAVA (2016): Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infect. Dis.* 16, 123.
- SMITH, I. (2003): *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 463-496.

- SMITH, N. H., R. G. HEWINSON, K. KREMER, R. BROSCHE, S. V. GORDON (2009): Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat. Rev. Microbiol. 7, 537-544.
- SMITH, S. M., W. W. VALE (2006): The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues Clin. Neurosci. 8, 383-395.
- STEELE, J. (1995): Introduction (part 2 regional and country status reports). U: *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. (Steele, J. H., C. O. Thoen ur.), Iowa State University Press, Ames, str. 169-172.
- STELLETTA, C., M. GIANESELLA, J. VENCATO, E. FIORE, M. MORGANTE (2012): Thermographic applications in veterinary medicine. U: Infrared Thermography. (Prakash, R. V., ur.), InTech, Rijeka, str. 117-140.
- STOLIĆ, I., M. POPOVIĆ, G. MRŠIĆ, K. VLAHOVIĆ, D. ŠPOLJARIĆ (2019): The effect of native propolis on serum biochemical parameters in weaned piglets. Vet. Arh. 89, 201-210.
- STREHL, C., L. EHLERS, T. GABER, F. BUTTGEREIT (2019): Glucocorticoids-All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. Front. Immunol. 10, 1744.
- SUNDER, S., P. LANOTTE, S. GODREUIL, C. MARTIN, M. L. BOSCHIROLI, J. M. BESNIER (2009): Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. J. Clin. Microbiol. 47, 1249-1251.
- SURMIK, D., T. SZCZYGIELSKI, K. JANISZEWSKA, B. M. ROTHSCILD (2018): Tuberculosis-like respiratory infection in 245-million-year-old marine reptile suggested by bone pathologies. R. Soc. Open Sci. 5, 180225.
- SWALLAH, M. S., H. FU, H. SUN, R. AFFOH, H. YU (2020): The impact of polyphenol on general nutrient metabolism in the monogastric gastrointestinal tract. J. Food Qual. 2020, 5952834.
- SZENTKUTI, A., H. SKALA KAVANAGH, S. GRAZIO (2011): Infrared thermography and image analysis for biomedical use. Period. Biol. 113, 385-392.

- ŠEGVIĆ-BUBIĆ, T., J. BOBAN, L. GRUBIŠIĆ, Ž. TRUMBIĆ, M. RADMAN, M. PERČIĆ, R. ČOŽ-RAKOVAC (2013): Effects of propolis enriched diet on growth performance and plasma biochemical parameters of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under acute low temperature stress. *Aquacult. Nutr.* 19, 877-885.
- ŠPIČIĆ, S., I. RAČIĆ, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, A. LABROVIĆ, T. KIŠ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, B. HABRUN, G. KOMPES, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2011): Tuberkuloza goveda u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na postupak certifikacije stada slobodnih od tuberkuloze. *Vet. Stanica.* 42, 401-406.
- TAMENI, S., M. AMADORI, P. SCACCAGLIA, R. QUONDAM-GIANDOMENICO, S. TAGLIABUE, I. L. ACHETTI, R. ADONE, F. CIUCHINI (1998): Quality controls and *in vitro* diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins. *Biologicals.* 26, 225-235.
- TASKER, J. G., S. DI, R. MALCHER-LOPES (2006): Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology.* 147, 5549-5556.
- TEPPAWAR, R. N., S. P. CHAUDHARI, S. L. MOON, S. V. SHINDE, W. A. KHAN, A. R. PATIL (2018): Zoonotic Tuberculosis: A Concern and Strategies to Combat. U: *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. (Enany, S., ur.), InTechOpen, London, str. 23-38.
- THAU, L., J. GANDHI, S. SHARMA (2021): Physiology, Cortisol. U: *StatPearls* (WEB izdanje - ažurirano 9. 2. 2021.). StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida; dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/>; posjećeno 15. 3. 2021.
- TIZARD, I. R. (2016a): Cellular Innate Immunity. U: *Veterinary Immunology: An Introduction*. 10th edition. (Tizard, I. R., ur.), Elsevier, St. Louis, str. 155-184.
- TIZARD, I. R. (2016b): T Cell-Mediated Hypersensitivity. U: *Veterinary Immunology: An Introduction*. 10th edition. (Tizard, I. R., ur.), Elsevier, St. Louis, str. 1082-1108.
- TIZARD, I. R. (2016c): How Immune Cells Communicate. U: *Veterinary Immunology: An Introduction*. 10th edition. (Tizard, I. R., ur.), Elsevier, St. Louis, str. 216-246.

- ULRICH-LAI, M. Y., J. P. HERMAN (2009): Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature neuroscience*. 10, 397-409.
- USMAN, A. N., A. Z. ABDULLAH, I. RAYA, B. BUDIAMAN, A. BUKHARI (2020): Glucocorticoid and cortisol hormone in response to honey and honey propolis supplementation in mild stress women. *Enferm. Clin.* 30, 1-4.
- UZZAMAN, A., S. H. CHO (2012): Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 33, 96-99.
- VAN CREVEL, R., T. H. M. OTTENHOFF, J. W. M. VAN DER MEER (2002): Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 294-309.
- VAYR, F., G. MARTIN-BLONDEL, F. SAVALL, J. M. SOULAT, G. DEFFONTAINES, F. HERIN (2018): Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006208.
- VELAYATI, A. A., P. FARNIA (2017): The Species Concept. U: *Atlas of Mycobacterium Tuberculosis*. (Velayati, A. A., P. Farnia, ur.), Academic Press, str. 1-16.
- VILAPLANA, C., P. J. CARDONA (2012): The Hidden History of Tuberculin. U: *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. (Cardona, P. J., ur.), InTech, Rijeka, str. 446-456.
- VISWANATHAN, K., C. DAUGHERTY, F. S. DHABHAR (2005): Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int. Immunol.* 17, 1059-1069.
- VOORHEES, J. L., N. D. POWELL, L. MOLDOVAN, X. MO, T. D. EUBANK, C. B. MARSH (2013): Chronic Restraint Stress Upregulates Erythropoiesis through Glucocorticoid Stimulation. *PLoS One*. 8:e77935.
- VUKMANOVIC-STEJIC, M., J. R. REED, K. E. LACY, M. H. A. RUSTIN, A. N. AKBAR (2006): Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. *Immunol. Lett.* 107, 93-101.
- WAGGONER, S. N. (2020): Circadian Rhythms in Immunity. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 20, 2.

- WAGH, V. D. (2013): Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013, 308249.
- WASHINGTON, I. M., G. VAN HOOSIER (2012): *Clinical Biochemistry and Hematology. U: The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* (Suckow, M. A., K. A. Stevens, R. P. Wilson, ur.), Elsevier, London, str. 57-116.
- WATERS, W. R., A. O. WHELAN, K. P. LYASHCHENKO, R. GREENWALD, M. V. PALMER, B. N. HARRIS, R. G. HEWINSON, H. M. VORDERMEIER (2010): Immune Responses in Cattle Inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 247-252;
- WEBSTER, J. I., L. TONELLI, E. M. STERNBERG (2002): Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 125-163.
- WEISS, G., U. E. SCHAIBLE (2015): Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182-203.
- WENG, Z., B. ZHANG, S. ASADI, N. SISMANOPOULOS, A. BUTCHER, X. FU, A. KATSAROU-KATSARI, C. ANTONIOU, T. C. THEOHARIDES (2012): Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS One.* 7, e33805.
- WHELAN, A. O., D. CLIFFORD, B. UPADHYAY, E. L. BREADON, J. MCNAIR, G. R. HEWINSON, M. H. VORDERMEIER (2010): Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3176-3181.
- WILLIAMS, W. R., M. S. JOHNSTON, S. HIGGINS, A. A. IZZO, L. V. KENDALL (2016): Blood profiles in unanesthetized and anesthetized guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Lab. Anim. (NY).* 45, 35-41.
- WOLFE, L. M., S. B. MAHAFFEY, N. A. KRUH, K. M. DOBOS (2010): Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Proteome Res.* 9, 5816-5826.

- WOLSKA, K., A. GORSKA, K. ANTOSIK, K. LUGOWSKA (2019): Immunomodulatory Effects of Propolis and its Components on Basic Immune Cell Functions. *Indian J. Pharm. Sci.* 81, 575-588.
- YANG, H., N. A. KRUH-GARCIA, K. M. DOBOS (2012): Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 66, 273-280.
- YASAR, M., Y. SAVRANLAR, H. KARAMAN, M. SAGIT, S. SILICI, I. OZCAN (2016): Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis. *Am. J. Otolaryng.* 37, 287–293.
- YASIR, M., A. GOYAL, S. SONTALIA (2023): Corticosteroid Adverse Effects. U: StatPearls (WEB izdanje - ažurirano 3. 7. 2023.). StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida; dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>; posjećeno 18. 1. 2024.
- YEAGER, M. P., P. A. PIOLI, J. COLLINS, F. BARR, S. METZLER, B. D. SITES, P. M. GUYRE (2016): Glucocorticoids enhance the *in vivo* migratory response of human monocytes. *Brain Behav. Immun.* 54, 86-94.
- YEAGER, M. P., P. A. PIOLI, P. M. GUYRE (2011): Cortisol Exerts bi-phasic Regulation of Inflammation in Humans. *Dose Response.* 9, 332-347.
- YILDRIM, Z., S. HACIEVLIYAGIL, N. O. KUTLU, N. E. AYDIN, M. KURKCUOGLU, M. IRAZ, R. DURMAZ (2004): Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacol. Res.* 49, 287-292.
- YOSHIKAWA, H., K. TASAKA. (2003): Anti-Allergic Action of Glucocorticoids: Comparison with Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Effects. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 2, 37-50.
- ZAWADZKI, F., I. N. PRADO, J. A. MARQUES, L. M. ZEOULA, P. P. ROTA, B. B. SESTARI, M. V. VALERO, D. C. RIVAROLI (2011): Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 16-25.

ZULHENDRI, F., R. LESMANA, S. TANDEAN, A. CHRISTOPER, K. CHANDRASEKARAN, I. IRSYAM, A. A. SUWANTIKA, R. ABDULAH, N. WATHONI (2022): Recent Update on the Anti-Inflammatory Activities of Propolis. *Molecules*. 27, 8473.

**9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM
OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH
RADOVA**

Anja Vujnović rođena je 17. srpnja 1985. godine u Našicama. Maturirala je 2003. godine Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Srednjoj školi Isidora Kršnjavoga u Našicama. Iste godine upisala je Veterinarski fakultet u Zagrebu, a diplomirala je 2010. godine. Diplomski rad naziva „Učinak splenektomije i autotransplantacije slezene kod svinja na crvenu krvnu sliku i morfologiju stanica krvi“ izradila je na Zavodu za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Nine Poljičak-Milas. Poslijediplomski sveučilišni studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2013. godine.

U travnju 2011. godine zaposlena je u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta na radnom mjestu stručnog suradnika u sustavu znanosti. U svibnju 2012. godine zaposlena je u Laboratoriju za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka na radnom mjestu stručnog suradnika u sustavu znanosti, a od srpnja 2018. godine radi u istom laboratoriju na mjestu višeg stručnog suradnika u sustavu znanosti. Područje njenog znanstveno-stručnog rada, djelovanja i odgovornosti vezani su za procjenu dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima u svrhu njihovog odobravanja za stavljanje u promet u Republici Hrvatskoj, kontrolu kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda te održavanje akreditacije u Laboratoriju sukladno Normi HR EN ISO/IEC 17025. Od 2017. do 2019. godine sudjelovala je u radu Radne skupine za neškodljivost veterinarsko-medicinskih proizvoda u Europskoj agenciji za lijekove i medicinske proizvode u Londonu.

Tijekom rada u Hrvatskom veterinarskom institutu prošla je edukacije vezane uz sustav upravljanja kvalitetom i akreditacije laboratorija sukladno Normi HR 17025. Također je sudjelovala u edukacijama i usavršavala se na području procjene dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima i rada s laboratorijskim životinjama na sljedećim radionicama:

1. Procjena dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima (“Training of quality assessors”), European Medicines Agency, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.
2. Radionica o prijavi promjena i procjeni dokumentacije o promjenama („Variation Workshop“), Medicademy u suradnji s HALMED-om i Hrvatskom farmaceutskom industrijom, Zagreb, Republika Hrvatska.
3. Procjena dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima (“F2F Quality of veterinary immunological products”), European Medicines Agency, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.
4. Procjena dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima (“QWP Training for Advanced Quality Assessors”), European Medicines Agency, London, Ujedinjeno Kraljevstvo.

5. Osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama (FELASA cat. C equivalent), Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, Republika Hrvatska.

Voditeljica je manjeg istraživačkog projekta naslova „*In vitro* inhibicija rasta najznačajnijih patogenih vrsta mikobakterija propolisom“ odobrenom odlukom Povjerenstva za procjenu pristiglih zahtjeva za namjensko institucijsko financiranje znanstvene djelatnosti sredstvima MZO-a u 2021. godini.

POPIS JAVNO OBJAVLJENIH RADOVA (ZNANSTVENIH I STRUČNIH) I POSTERA:

Prilog u knjizi

- izvorni znanstveni rad

1. POLJIČAK-MILAS, N., A. VUJNOVIĆ, J. MIGIĆ, D. VNUK, M. KARDUM (2012): The effects of splenectomy and autologous spleen transplantation on complete blood count and cell morphology in a porcine model. U: Hematology - Science and Practice. (Lawrie, C. H., ur.), InTech, Rijeka, str. 553-572.

Prilog u časopisu

- izvorni znanstveni rad

1. ŠANDOR, K., E. PERAK JUNAKOVIĆ, S. TERZIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, D. FAJDIĆ, M. PEHNEC, S. SINKOVIĆ, I. ČALETA, M. ANDRIŠIĆ (2024): A Green HPLC Approach to Florfenicol Analysis in Pig Urine. *Pharmaceuticals*. 17, 495.
2. PERAK JUNAKOVIĆ, E., K. ŠANDOR, S. TERZIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, M. BENIĆ, D. FAJDIĆ, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, I. ŽARKOVIĆ (2023): Influence of Encapsulation of Propolis Extract with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on Polyphenolic Contents during *In Vitro* Simulation of Digestion. *Appl. Sci. (Basel)*. 13, 9357.
3. PERAK JUNAKOVIĆ, E., K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, N. ORŠOLIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, D. FAJDIĆ, S. SINKOVIĆ,

S. TERZIĆ (2023): Spectrophotometric determination of the main polyphenol groups in propolis samples from different regions of Croatia. Vet. Arh. 93, 257-270.

4. ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. BENDELJA, A. SAVIĆ MLAKAR, N. ORŠOLIĆ, L. ŠVER, M. BENIĆ, S. TERZIĆ (2022): Effects of immunostimulators of microbial origin on T cells of pigs vaccinated with attenuated vaccine against Aujeszky's disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 243, 110365.
5. ŽARKOVIĆ, I., M. ANDRIŠIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, M. ŠPERANDA, H. VALPOTIĆ, A. JUNGIĆ, M. BENIĆ, L. CVETNIĆ, S. TERZIĆ (2022): Influence of immunomodulators of viral or bacterial origin and vaccine against Aujeszky's disease on the proportion of peripheral blood B cells in growing pigs. Vet. Stanica. 53, 251-259.
6. ŠANDOR, K., M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, S. TERZIĆ (2020): Development of an SPE-HPLC-DAD method for the experimental study of florfenicol and florfenicol amine in pig cerebrospinal fluid. Vet. Stanica. 51, 129-138.
7. ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, H. VALPOTIĆ, K. BENDELJA, Ž. CVETNIĆ, F. BOŽIĆ, S. TERZIĆ (2020): Phenotype analysis of CD3+CD16+ lymphocytes in the peripheral blood of pigs. Vet. Stanica. 51, 117-128.
8. RAČIĆ, I., S. ŠPIČIĆ, A. GALOV, S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, A. VUJNOVIĆ, B. HABRUN, Ž. CVETNIĆ (2014): Identification of *Coxiella burnetii* genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis. Vet. Microbiol. 173, 340-347.
9. ŠPIČIĆ, S., M. ZDELAR-TUK, I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. BENIĆ, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ (2013): Sensitivity of Actual Laboratory Diagnostic Methods Used for Surveillance of Swine brucellosis in Croatia. Int. J. Appl. Res. Vet. M. 11, 167-173.

10. DOBRANIĆ, V., N. ZDOLEC, I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, I. FILIPOVIĆ, N. GRGUREVIĆ, S. ŠPIČIĆ (2013): Determination of enterotoxin genes in coagulase- negative staphylococci from autochthonous Croatian fermented sausages. Vet. Arh. 83, 145-152.
11. ŠPIČIĆ, S., A. VUJNOVIĆ, I. RAČIĆ, M. ZDELAR TUK, S. DUVNJAK, I. LOHMAN JANKOVIĆ, T. KIŠ, Ž. CVETNIĆ (2013): Leptospiroza ovnova i jarčeva u Hrvatskoj. Vet. Stanica. 44, 11-17.
12. ZDOLEC, N., I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, K. MATANOVIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. DOBRANIĆ, Ž. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ (2013): Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Spontaneously Fermented Sausages. Food Technol. Biotech. 51, 240-246.
13. ŠPIČIĆ, S., I. RAČIĆ, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, A. LABROVIĆ, T. KIŠ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, B. HABRUN, G. KOMPES, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2011): Tuberkuloza goveda u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na postupak certifikacije stada slobodnih od tuberkuloze. Vet. Stanica. 42, 401-406.

- **pregledni rad (stručni)**

1. VRETENAR ŠPIGELSKI, K., E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, S. SINKOVIĆ, I. ŽARKOVIĆ, D. FAJDIĆ, S. TERZIĆ (2021): Mineralna ulja u ulozi adjuvansa u veterinarskim cjepivima. Vet. Stanica. 52, 579-586.
2. TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, D. FAJDIĆ (2020): Konvencija Vijeća Europe o krivotvorenju farmaceutskih proizvoda i sličnim kažnjivim djelima koja uključuju prijetnje javnom zdravlju. Vet. Stanica. 51, 1-4.

- **pregledni rad (znanstveni)**

1. PERAK JUNAKOVIĆ, E., K. ŠANDOR, A. VUJNOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, S. SINKOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, M. PEHNEC, D. FAJDIĆ, S. TERZIĆ (2019): Određivanje antimikrobnih lijekova u otpadnim vodama. Vet. Stanica. 50, 445-454.

- **stručni rad**

1. TERZIĆ, S., M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ, E. PERAK JUNAKOVIĆ, K. VRETENAR ŠPIGELSKI, S. SINKOVIĆ, M. PEHNEC, D. FAJDIĆ, K. ŠANDOR (2020): Mogućnost primjene neodobrenih veterinarsko-medicinskih proizvoda (off - label use). Vet. Stanica. 51, 455-461.

Prilog sa skupa (u zborniku)

- **izvorni znanstveni rad**

1. ŠPIČIĆ, S., M. ZDELAR-TUK, I. RAČIĆ, S. DUVNJAK, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2012): Bruceloza svinja u Hrvatskoj u 2011. godini. Zbornik radova desetog savetovanja sa međunarodnim učešćem "Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja", 31. svibnja - 2. lipnja, Požarevac, Srbija, str. 65-69.

- **sažetak izlaganja sa skupa**

1. ZDELAR-TUK, M., I. RAČIĆ, Ž. CVETNIĆ, S. DUVNJAK, A. VUJNOVIĆ, S. ŠPIČIĆ (2012): Serologic evidence of *Leptospira* spp. serovars in cattle in Croatia. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012, 31. svibnja - 2. lipnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 30-31.
2. CVETNIĆ, Ž., I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, S. ŠPIČIĆ (2012): Proširenost leptospiroze svinja u Republici Hrvatskoj u 2011. godini. Zbornik radova desetog savetovanja sa međunarodnim učešćem "Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja", 31. svibnja - 2. lipnja, Požarevac, Srbija, str. 70-70.

3. VUJNOVIĆ, A., I. RAČIĆ, M. ZDELAR-TUK, Ž. CVETNIĆ, S. DUVNJAK, S. ŠPIČIĆ, (2012): Leptospirosis in bucks and rams in Croatia. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012, 31. svibnja - 2. lipnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 81-81.
4. ŠPIČIĆ, S., J. TONČIĆ, I. VICKOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ (2012): Seroprevalence of leptospirosis in jackals from Nature Park Lonjsko Polje and landscape Spačva forest. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012, 31. svibnja - 2. lipnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 80-80.
5. RAČIĆ, I., A. VUJNOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, Ž. CVETNIĆ, S. DUVNJAK, S. ŠPIČIĆ (2012): Seroepizootiological investigation of Leptospirosis in swine in Croatia. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012, 31. svibnja - 2. lipnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 75-76.
6. ŠPIČIĆ, S., M. ZDELAR-TUK, I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ (2012): Incidence of leptospiral abortion in cattle in Croatia. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012, 31. svibnja - 2. lipnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 79-79.
7. VUJNOVIĆ, A., N. POLJIČAK-MILAS, M. KARDUM, D. VNUK (2011): The effects of splenectomy and autologous spleen transplantation on complete red blood cell count, platelet count and cell morphology in a porcine model. Book of Abstracts, The International Congress "Veterinary science and profession", 3. travnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 70-70.
8. ŠPIČIĆ, S., V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, I. RAČIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2011): Mycobacterium sp. isolated from cattle in Croatia during the process of certification of herds free of bovine tuberculosis. Book of Abstracts, The International Congress „Veterinary science and profession“, 3. travnja, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 38-38.

9. ŠPIČIĆ, S., V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, I. RAČIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, A. VUJNOVIĆ, Ž. CVETNIĆ (2011): Nontuberculous mycobacteria and unspecific tuberculin skin reaction in cattle in Croatia. Abstract Book, ESM, Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 26. - 29. lipnja, Lübeck, Njemačka, str. 80-81.
10. POLJIČAK-MILAS, N., A. VUJNOVIĆ, D. VNUK, S. MILINKOVIĆ-TUR (2010): Hematological changes in piglets undergoing splenectomy and autologous spleen transplantation. First European Joint Congress of EFCC and UEMS "Laboratory Medicine in Health Care, Laboratory Medicine at the Clinical Interface": Abstracts Book, 13. - 16. listopada, Lisabon, Portugal, str. 172-172.

- stručni rad

1. TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ (2016): Krivotvoreni veterinarsko-medicinski proizvodi. 6. Hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Zbornik radova, 26. - 29. listopada, Opatija, Republika Hrvatska, str. 55-61.

Ocjenski radovi

1. VUJNOVIĆ, A. (2010): Učinak splenektomije i autotransplantacije slezene kod svinja na crvenu krvnu sliku i morfologiju stnica krvi. Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Zagreb, Republika Hrvatska.