Utjecaj eteričnih ulja Xtract tm i prirodnog zeolita na morfometrijske pokazatelje krvnih stanica

Tomas, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:993283

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

KLARA TOMAS

UTJECAJ ETERIČNIH ULJA XTRACT™ I PRIRODNOG ZEOLITA NA MORFOMETRIJSKE POKAZATELJE KRVNIH STANICA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Zavod za patološku fiziologiju

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnica: Prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

Mentor: Prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Mirna Robić

2. Doc. dr. sc. Maja Belić

3. Prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

4. Doc. dr. sc. Romana Turk (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Nini Poljičak Milas te znanstvenom novaku Matku Kardumu, dr. med. vet. na savjetima, velikoj pomoći i podršci te stručnom vodstvu prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, iskreno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene kroz sve godine studiranja.

POPIS PRILOGA

SLIKE

Slika 1. Morfometrijska analiza limfocita.

Slika 2. Morfometrijska analiza monocita.

Slika 3. Površina eritrocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Slika 4. Zakrivljenost površine eritrocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Slika 5. Površina limfocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Slika 6. Zakrivljenost površine limfocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Slika 7. Površina monocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Slika 8. Zakrivljenost površine monocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

TABLICE

Tablica 1. Morfometrijski pokazatelji eritrocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.

K = kontrolne skupine; X+Z = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

Tablica 2. Morfometrijski pokazatelji limfocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.

K = kontrolne skupine; X+Z = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

Tablica 3. Morfometrijski pokazatelji monocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.

K = kontrolne skupine; CK = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. 0PĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....4

3. MATERIJALI I METODE.....5

3.1. Krvni razmazi.....5

3.2. Morfometrijska analiza krvnih stanica.....6

3.3. Statistička obrada.....7

4. REZULTATI.....8

5. RASPRAVA.....20

6. ZAKLJUČCI.....24

7. POPIS LITERATURE.....25

8. SAŽETAK.....30

9. SUMMARY.....31

10. ŽIVOTOPIS.....32

1. UVOD

Kompjutorska analiza slike (morfometrija) se primjenjuje na različitim poljima dijagnostike u kliničkim laboratorijima, omogućujući numeričku ocjenu i najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnom pregledu. Baak (1985.) definira morfometriju kao kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama. Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog značenja je što se može koristiti standardno obrađeni materijal (Oberholzer i sur., 1991.). Osim toga, rezultati mjerenja (primarni podaci) mogu se koristiti za izračun novih podataka (sekundarni podaci), a svi se mogu statistički obraditi (Baak, 1985.; Oberholzer i sur., 1991.).

Morfometrijski pokazatelji mogu se podijeliti na: 1. Jednostavne pokazatelje: *površina, opseg, promjer, polumjer, najduža i najkraća os objekta* (izražavaju se kao jedinične vrijednosti); 2. Faktore oblika *(engl. shape factor)* koji mjere (ne)pravilnosti objekta, a izražavaju se kao nejedinične vrijednosti: f*aktor zaokruženosti objekta* (FF – *engl. form factor*) (Crocker i sur., 1983.; Crocker i sur., 1983.a) koji mjeri stupanj zaokruženosti pojedinačnog objekta ($FF=4\pi$ x površina/opseg^2), ima vrijednost 1 za krug, <1 za elipse te <<1 za jako nepravilne oblike (nepravilni rubovi ili varijabilnost oblika); *faktor izduženosti objekta* (omjer dužine i širine); *konveksnost ili zakrivljenost površine (engl. convex area)*, definirana kao površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama (Murata i sur., 2003.; Namyslowski i sur., 2004.) te *faktor sličan stupnju ispunjenosti (engl. area/convex area)*, koji predstavlja omjer površine i konveksne površine; 3. Kontekstualne pokazatelje: *površina nakupine, broj elemenata po nakupini, udaljenost između nakupina, itd.*; 4. Dvofazne pokazatelje: *nukleo-citoplazmatski omjer (N/C i, nukleo-nukleolarni omjer (N/N).*

Istraživanja ukazuju na potrebu određivanja morfometrijskih i morfofunkcionalnih pokazatelja krvnih stanica u rasvjetljavanju adaptivnih mehanizama, odnosno staničnih odgovora na stres (Renaudeau, 2012.). Tijekom intenzivnog tova izloženost peradi brojnim stresorima iz okoline uzrokuje izlučivanje stresnih hormona, promjene metaboličke regulacije, intenziteta oksidacijskih reakcija i antioksidacijske zaštite, aktivacije komponenti nespecifične i specifične imunosne obrane organizma što će dovesti do različitih promjena i prilagodbi u njihovom organizmu (Post i sur., 2003.). Korištenjem antimikrobnih promotora rasta djelomično su se prevenirala takva stanja. Nakon zabrane njihove uporabe u animalnoj hrani od strane Europske unije 2006. godine započeta su intenzivna istraživanja za adekvatnom zamjenom.

Fitogeni ili fitobiotici (engl. *phytobiotic*) definiraju se kao komponente dobivene iz biljaka i uklopljene u hranu s ciljem poboljšavanja proizvodnih svojstava stoke (Lawrence i Reynolds, 1984.). Imaju sposobnost izazvati željeni odgovor u životinje, kako u nutritivnom smislu, tako i promjenom metaboličke funkcije, a posljedično utječu na rast same jedinke (Hashemi i Davoodi, 2010.). Relativno su mlada skupina dodataka hrani koja je zadnjih godina privukla značajnu pažnju industrije koja se bavi proizvodnjom hrane za životinje (Hashemi i Davoodi, 2010.). Imaju cijeli niz prednosti jer su prirodni, dokazano manje toksični, ne stvaraju rezidue, te su se kao takvi učinili jako zanimljivi kao zamjena za antibiotske promotore rasta u hrani (Windisch i sur., 2007.). U fitogene spada veliki broj bilja, začina, kao i proizvoda koji su od njih dobiveni, koje u najvećoj mjeri čine eterična ulja (Hashemi i Davoodi, 2010.).

Pozitivan učinak eteričnih ulja i njihovih komponenti na osobine rasta i zdravlje životinja posljedica su mnogobrojnih svojstva među kojima valja istaknuti njihovo protuupalno i antioksidativno djelovanje, poboljšanje okusa i unosa hrane, poticanje izlučivanja probavnih enzima, povećanje motiliteta želuca i crijeva, stimulaciju endokrinog i imunosnog sustava, te antimikrobni, antiviralni i kokcidiostatski učinak, zbog čega ih se sve više pokušava prikazati kao prirodne promotore rasta (Kirkpinar i sur, 2010.). Također je moguće kombinirati različita eterična ulja ili njihove komponente kako bi se postigao sinergistički učinak i na taj način još više poboljšala njihova djelotvornost (Yang i sur., 2009.). U ovom istraživanju, u hranu tovnih pilića primiješan je XTRACT^{TM} (kombinacija komponenti eteričnih ulja karvakrola, cinamaldehida i kapsaicina) i prirodni zeolit klinoptilolit. Karvakrol je komponenta eteričnih ulja mravinca i timijana, cinamaldehid se nalazi u eteričnom ulju cimeta, a kapsaicin je djelatna tvar eteričnog ulja ljute crvene paprike. Zeoliti su prirodni hidratizirani aluminosilikati porozne

strukture koji lako gube i primaju vodu, a da se pri tome njihova struktura ne mijenja (Eleroğlu i Yalçın, 2005.).

Uzevši u obzir brojna istraživanja o pozitivnim učincima eteričnih ulja i činjenicu da intenzivan tov narušava homeostazu organizma, možemo pretpostaviti da će dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita u hrani tijekom tova pilića rezultirati promjenom morfometrijskih pokazatelja krvnih stanica, uslijed adaptivnih mehanizama koji su posljedica staničnog odgovora na stres.

2. 0PĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog istraživanja je procijeniti dijagnostički značaj digitalne analize morfometrijskih pokazatelja eritrocita, limfocita i monocita u kontrolne skupine i skupine pilića kojima su u hranu dodani fitogeni pripravci sa antioksidativnim i imunomodulacijskim učinkom tijekom intenzivnog tova. Tov kao tehnološki proces može narušiti homeostazu organizma pa je potrebno procijeniti reakciju na stres i adaptivan odgovor stanica krvi.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti morfometrijske značajke eritrocita, limfocita i monocita pilića u razmazu periferne krvi.
2. Utvrditi postoje li razlike između morfometrijskih pokazatelja između kontrolne skupine i skupine životinja kojima su u hranu dodana eterična ulja.

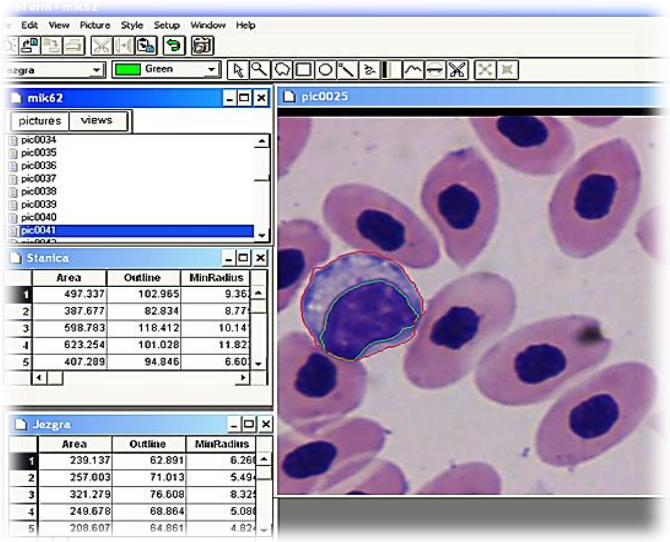
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Krvni razmazi

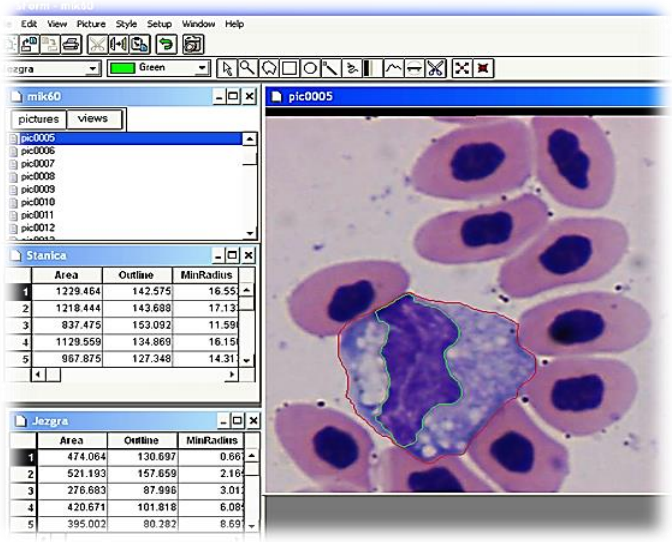
Istraživanje je provedeno na obojanim krvnim razmazima pilića hibrida Ross 308, arhiviranim tijekom pokusa organiziranog za izradu doktorske disertacije Brigite Hengl, dr. med. vet. „UTJECAJ ETERIČNIH ULJA I PRORODNOG ZEOLITA NA PROIZVODNE I ZDRAVSTVENE POKAZATELJE PILIĆA, TE MIKROBIOLOŠKU ISPRAVNOST PILEĆEG MESA“, Osijek, 2012. Mentori su bili dr. sc. Marcela Šperanda, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, te dr. sc. Hrvoje Pavlović, docent Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku. U pokusu provedenom za potrebe navedene doktorske disertacije korišteni su brojleri hibrida Ross 308. Uzgoj pilića proveo se na farmi tovnih pilića Štefanec, Pipo Čakovec. Pilići su držani u zidanom objektu sa betonskim podom, automatskom regulacijom ventilacije, temperature, vlage i osvjetljenja u objektu. Sterilizirana sjeckana slama koristila se kao stelja, a kavezi za istraživanje, veličine $1m^2$ bili su izrađeni od žice. Pilići su bili podijeljeni u četiri skupine od 16 pilića, kontrolnu skupinu 1 (K21), kontrolnu skupinu 2 (K42), pokusnu skupinu 1 (P21) i pokusnu skupinu 2 (P42). Svi pilići bili su hranjeni sa starterom do 15. dana tova, finišerom-1 do 24. te finišerom-2 do kraja tova, a pristup hrani i vodi bio je neograničen. Pri tome je od prvoga dana tova pokusnim skupinama pilića u standardnu smjesu bila primiješana kombinacija komponenti eteričnih ulja XTRACT^{TM} u količini od 100g/t i 2000g/t prirodnog zeolita klinoptilolita. Uzorkovanje krvi provedeno je 21. te 42. dana tova, a uzorci su uzimani punkcijom krilne vene u epruvete s podtlakom i heparinom kao antikoagulantnim sredstvom (BD Vacutainer, LH 102 I. U.). Krvni razmazi učinjeni su metodom razvlačenja i standardno obojeni prema May-Grünwald Giemsi. Za potrebe morfometrijskih mjerenja krvnih stanica korišteno je po devet krvnih razmaza od svake pojedine skupine (K21, K42, P21, P42), na kojima se, pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX 41) pod imerzionim objektivom povećanja 100× i visokorezolutne kamere u boji (Donpisha 3CCD) po svakom krvnom razmazu slikalo najmanje 101 do 130 eritrocita, 101 do 110 limfocita te 20 do 40 monocita (Slike 1 i 2).

3.2. Morfometrijska analiza krvnih stanica

Morfometrija stanica krvi napravljena je na osobnom računalu s podržavajućim programom "SFORM" tvrtke VAMSTEC, Zagreb. Granice citoplazme i jezgre eritrocita, limfocita i monocita označavale su se interaktivno uz ručnu korekciju kompjutorskim mišem (Slike 1 i 2). Za navedene stanice i njihove jezgre određivali su se slijedeći pokazatelji: površina i zakrivljenost u kvadratnim mikrometrima (μm^2), te opseg, minimalni i maksimalni polumjer, dužina i širina u mikrometrima (µm). Iz dobivenih podataka za površinu jezgre i cijele stanice eritrocita, limfocita i monocita izračunat je odnos jezgre i citoplazme (N/C) (engl – nuclear/citoplasmic volume ratio). Ukupno je analizirano 12 582 objekata (stanica i jezgara) na svih 36 krvnih razmaza.



Slika 1. Morfometrijska analiza limfocita.



Slika 2. Morfometrijska analiza monocita.

3.3. Statistička obrada

Statistička obrada rezultata izvršena je uz pomoć kompjuterskog programa za analizu podataka STATISTIKA, 12 (StatSoft, Inc. 2013.). Normalnost raspodjele podataka provjerena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Za svaku kontinuiranu varijablu izračunat je medijan (M) kao mjera centralne tendencije i vrijednost koja niz vrijednosti poredan po veličini dijeli na dva jednaka dijela te donji i gornji kvartil kao mjeru disperzije ili stupnja varijabilnosti. Značajnost razlika između pojedinih skupina za opseg, minimalni radijus, zakrivljenost i dužinu eritrocita te opseg jezgre eritrocita, zatim površinu, opseg, minimalni radijus, zakrivljenost i dužinu monocita te minimalni radijus jezgre monocita provjerena je analizom varijance (ANOVA), dok je značajnost razlika između skupina ostalih mjerenih pokazatelja, sa nepravilnom raspodjelom podataka, analizirana neparametrijskim Kruskal-Wallis testom. Vrijednost p jednaka ili manja od 0,05 smatrala se statistički značajnom.

4. REZULTATI

Osnovne morfometrijske karakteristike eritrocita, limfocita i monocita, te njihovih jezgara prikazane su u tablicama 1 – 3.

Usporedbom morfometrijskih značajki stanica i jezgri eritrocita u kontrolnim skupinama i skupini pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja 21. i 42. dana tova (Tablica 1), statistički značajne razlike nađene su u svim istraživanim varijablama: površini, opsegu, minimalnom radijusu, maksimalnom radijusu, zakrivljenosti, dužini, širini, te u odnosu jezgre i citoplazme (N/C). Iz Tablice 1 vidljivo je statistički značajno smanjenje maksimalnog polumjera i dužine eritrocita u kontrolnoj skupini 42. dana tova (K42) u odnosu na kontrolnu skupinu 21. dana tova (K21), te isto tako značajno smanjenje navedenih varijabli u pokusnoj skupini 42. dana (P42) u odnosu na 21. dan (P21). Maksimalni polumjer i dužina nisu se mijenjali tijekom tova između K21 i P21 te K42 i P42 skupine, a značajno smanjenje vidljivo je 42. dana u pokusnoj skupini naspram kontrolne skupine 21. dana tova. Značajno smanjenje minimalnog polumjera i širine eritrocita zabilježeno je u K42 i P21 skupni u odnosu na K21 skupinu, dok su vrijednosti za iste varijable u pokusnoj skupni 42. dana tova značajno porasle s obzirom na kontrolne skupine i pokusnu skupinu 21. dana tova. Sličnim načinom mijenjale su se vrijednosti površine i zakrivljenosti eritrocita, pri čemu je statistički značajno smanjenje uočeno u K42 i P21 skupini u odnosu na K21 skupinu. Međutim, u pokusnoj skupini 42. dana došlo je do značajnog porasta naspram K42 i P21 skupine, dok su vrijednosti površine i zakrivljenosti eritrocita ostale nepromijenjene između K21 i P42 skupine. Značajno smanjenje opsega eritrocita zabilježeno je u kontrolnoj skupini 42. i pokusnoj 21. dana tova u odnosu na K21 skupinu. Promjene vrijednosti opsega vidljive su u pokusnoj skupini 42. dana kada je došlo do njegova značajnog porasta u odnosu na K42 skupinu, smanjenja naspram K21 skupine, a ostao je nepromijenjen u odnosu na P21 skupinu.

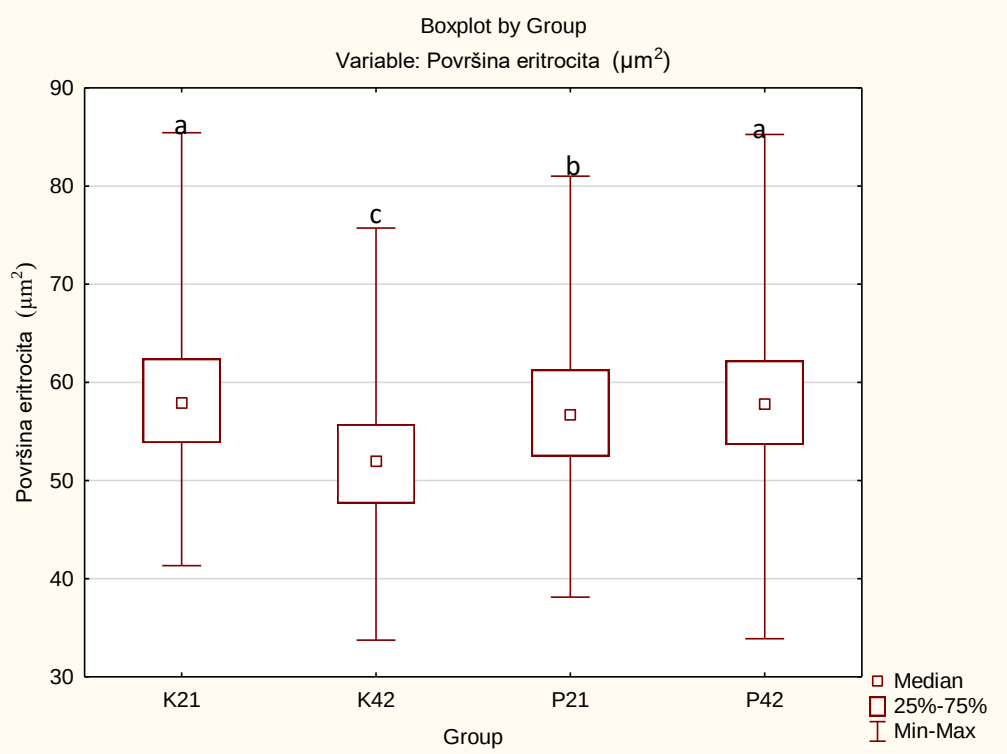
Također, iz Tablice 1 vidljive su promjene morfometrijskih pokazatelja jezgri eritrocita. Vrijednost minimalnog polumjera i širine jezgre eritrocita nije se mijenjala između K21 i K42 skupine, dok je statistički značajno smanjenje zabilježeno u P21 skupini naspram kontrole 21. dana tova. Do statistički značajnog porasta navedenih varijabli došlo je 42. dana tova s obzirom na K21, K42, i P21 skupinu. Površina i zakrivljenost jezgri eritrocita značajno se smanjila u kontrolnoj skupini 42., te pokusnoj skupini 21. dana u odnosu na K21 skupinu. Statistički

značajan porast istih varijabli uočavamo uspoređujući pokusnu skupinu 42. dana sa K42 i P21 skupinom, a vrijednosti su ostale nepromijenjene s obzirom na kontrolnu skupinu 21. dana. Opseg jezgre eritrocita značajno se smanjio u K42 i P21 skupini naspram K21 skupine, a njegov značajan porast zabilježen je tek 42. dana tova u P42 skupini u odnosu na K42 i P21 skupinu, iako se nije mijenjao uspoređujući sa K21 skupinom. Na sličan način mijenjale su se vrijednosti dužine jezgre eritrocita gdje je došlo do značajnog smanjenja u K42 i P21 skupini u odnosu na K21 skupinu. 42. dana tova u P42 skupini i dalje se uočava značajno smanjenje dužine jezgre eritrocita uspoređujući sa K21 i P21 skupinom, no u odnosu na K42 skupinu vidljiv je statistički značajan porast dužine jezgre eritrocita. Maksimalni polumjer jezgre eritrocita jednak je u K21 i P21 skupini, ali značajno manji u K42 skupini naspram K21 skupine. Njegova vrijednost je također jednaka u K42 i P42 skupini, ali je vidljivo značajno smanjenje 42. dana ako se uspoređuje sa vrijednostima K21 i P21 skupine. Odnos citoplazme i jezgre eritrocita značajno je porastao u K42 skupini, dok se smanjio u P21 skupini u odnosu na kontrolu 21. dana. U pokusnoj skupini 42. dana uočava se značajno smanjenje N/C omjera uspoređujući sa K21 i K42 skupinom, a porast u odnosu na P42 skupinu.

Tijekom istraživanja također su se mijenjale i morfometrijske značajke limfocita. Iz Tablice 2 vidljivo je značajno povećanje opsega, dužine i širine limfocita u K42, P21 i P42 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu 21. dana tova. Međutim, usporedbom P42 skupine s K42 i P21 nije došlo do značajnih promjena vrijednosti navedenih varijabli. Na sličan način mijenjale su se vrijednosti površine, minimalnog polumjera i zakrivljenosti površine limfocita, pri čemu je zabilježen značajan porast u K42, P21 i P42 skupini naspram K21 skupine. Nisu uočene promjene usporedbom P21 i P42 skupine, no zabilježeno je značajno smanjenje tih varijabli u P42 skupini naspram K42 skupine. Maksimalni polumjer je značajno porastao u K42, P21 i P42 skupini u odnosu na K21 skupinu. Također je njegov porast vidljiv i u P42 skupini uspoređujući sa P21 skupinom, dok u kontrolnoj i pokusnoj skupini 42. dana nisu zabilježene značajne promjene. Vrijednosti opsega, zakrivljenosti površine, maksimalnog polumjera i dužine jezgre limfocita značajno su porasle u K42, P21 i P42 skupini s obzirom na K21 skupinu, potom je zabilježen njihov pad u P42 skupini u odnosu na K42 i P21. Površina jezgre limfocita značajno je porasla u K42 i P21 s obzirom na K21 skupinu, dok je u P42 skupini vidljiv pad u odnosu na obje kontrolne skupine, a promjena nema između pokusnih skupina. Porast minimalnog polumjera jezgre limfocita je zamijećen u K42 i P42 skupini uspoređujući sa K21 skupinom, te u

P42 skupini u odnosu na P21. Smanjenje minimalnog polumjera uočavamo u P42 skupini naprema K42 skupini, dok se između kontrolne i pokusne skupine 21. dana nije mijenjao. Porast širine zabilježen je u K42 skupini naspram K21, a pad u P42 naspram K42 skupine. Statistički značajno smanjenje vrijednosti odnosa jezgre i citoplazme limfocita nalazimo u P21, P42 i K42 skupini u usporedbi sa kontrolnom skupinom 21. dana, te isto tako pad N/C omjera u P42 skupini u odnosu na K42 i P21.

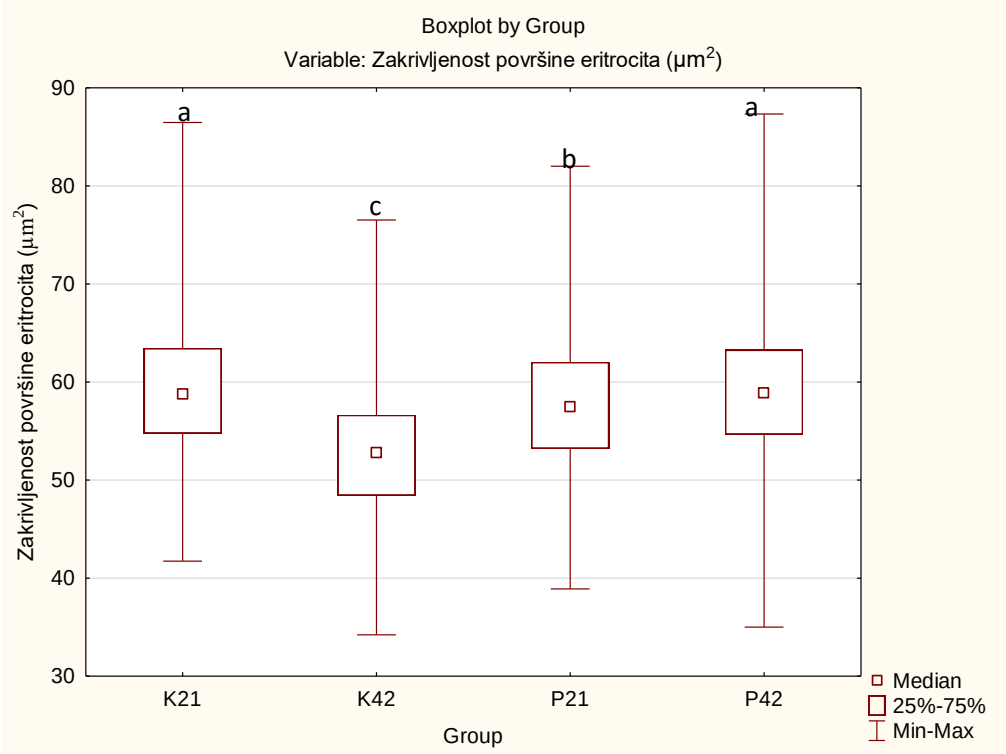
U Tablici 3 prikazane su vrijednosti stanica i jezgri monocita. Površina, opseg, maksimalni polumjer, zakrivljenost površine, dužina i širina stanica monocita rasle su u K42 i P42 skupini s obzirom na K21 skupinu, a porast je zabilježen i u P42 skupini u odnosu na P21 skupinu. Uspoređujući obje pokusne skupine sa kontrolnim skupinama (K21:P21, K42:P42) nema promjena vrijednosti navedenih varijabli. Minimalni polumjer stanice monocita u P21, P42 i K42 nije se mijenjao u odnosu na K21 skupinu, a ostao je nepromijenjen i u P42 skupini u odnosu na K42 skupinu. Porast minimalnog polumjera uočavamo između P42 i P21 skupine. Vrijednosti površine, maksimalnog polumjera i dužine jezgre monocita rastu kod K42 i P42 skupine u odnosu na kontrolnu skupinu 21. dana. Uspoređujući obje pokusne skupine sa kontrolnim skupinama (K21:P21, K42:P42) nema promjena vrijednosti navedenih varijabli. Zakrivljenost površine jezgri monocita nije se mijenjala u P21 i P42 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu 21. dana, a isto tako nema promjena u P42 skupini u odnosu na K42 i P21. Porast u zakrivljenosti jezgre uočavamo kod K42 skupine s obzirom na K21 skupinu. Odnos jezgre i citoplazme monocita nije se mijenjao u P21 i P42 skupini, dok je u K42 zabilježen njegov pad naspram K21 skupine. Pad N/C omjera vidljiv je u P42 skupini u odnosu na K42 i P21. Tijekom istraživanja nisu se mijenjale širina, opseg i minimalni polumjer jezgri monocita.



Slika 3. Površina eritrocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.
Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

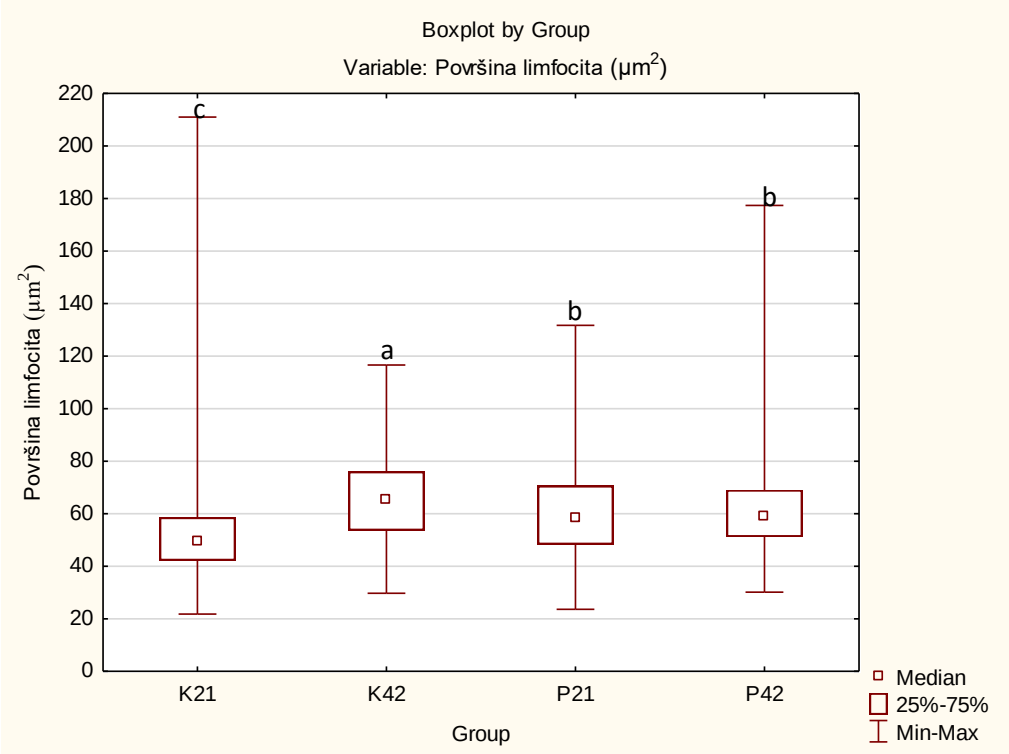
Na slici 3 prikazano je kretanje vrijednosti površine eritrocita. Uočava se statistički značajno niža vrijednost površine eritrocita u kontrolne skupine 42. dana i pokusne skupine 21. dana tova naspram kontrole 21. dana. Međutim, u pokusnoj skupini 42. dana došlo je do značajnog porasta površine eritrocita u odnosu na kontrolu 42. i pokusnu skupinu 21. dana, no ponovno na vrijednosti kontrole 21. dana.



Slika 4. Zakrivljenost površine eritrocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.
Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

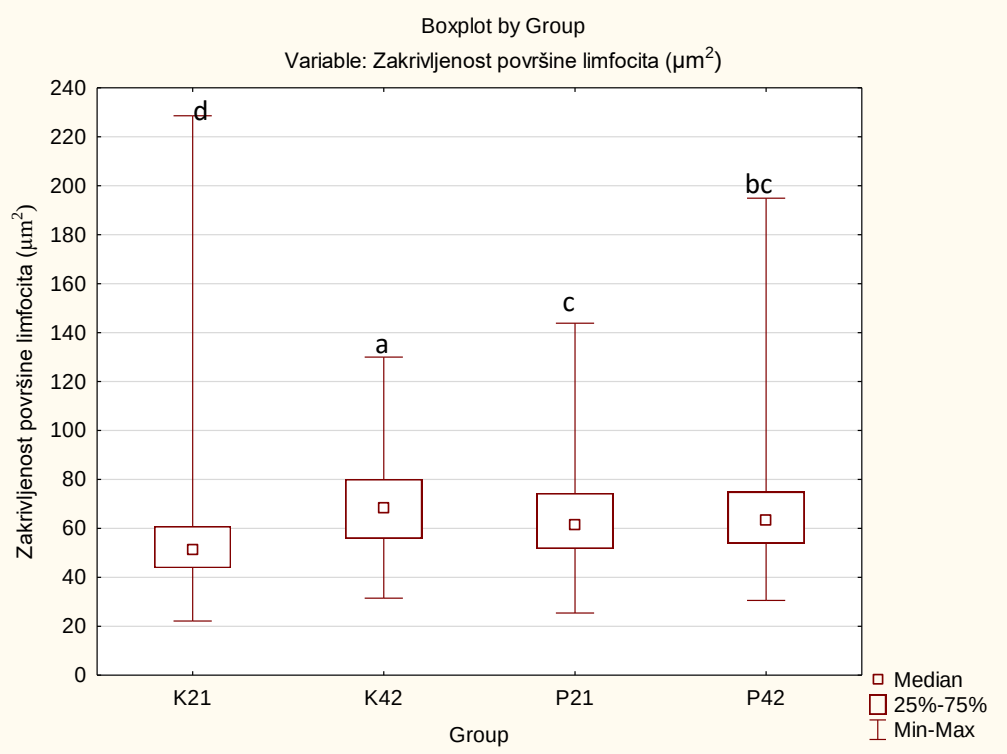
Na slici 4 prikazano je kretanje vrijednosti zakrivljenosti površine eritrocita tijekom istraživanja. Uočava se statistički značajno niža vrijednost zakrivljenosti površine eritrocita u kontrolne skupine 42. dana i pokusne skupine 21. dana tova naspram kontrole 21. dana. Međutim, u pokusnoj skupini 42. dana došlo je do značajnog porasta zakrivljenosti površine eritrocita u odnosu na kontrolu 42. i pokusnu skupinu 21. dana, no ponovno na vrijednosti kontrole 21. dana.



Slika 5. Površina limfocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.
Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

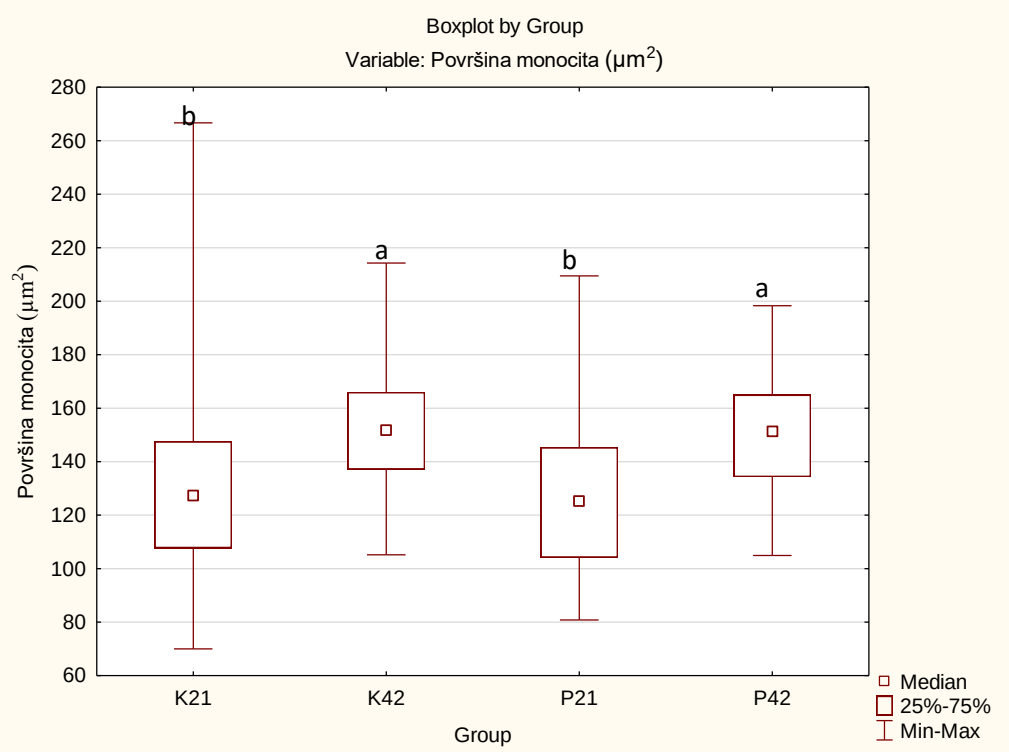
Kretanje vrijednosti površine limfocita prikazane su na slici 5. Vidljiv je značajan porast vrijednosti površine u kontrolnoj skupini 42. dana te u obje pokusne skupine naspram kontrole 21. dana. Nisu uočene promjene uspoređujući međusobno pokusne skupine, no zabilježeno je značajno smanjenje površine 42. dana u pokusnoj skupini u odnosu na kontrolu istog dana.



Slika 6. Zakrivljenost površine limfocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.
Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Na slici 6 prikazane su vrijednosti zakrivljenosti površine limfocita. Vidljiv je značajan porast vrijednosti zakrivljenosti površine u kontrolnoj skupini 42. dana te u obje pokusne skupine naspram kontrole 21. dana. Nisu uočene promjene uspoređujući međusobno pokusne skupine, no zabilježeno je značajno smanjenje zakrivljenosti površine 42. dana u pokusnoj skupini u odnosu na kontrolu istog dana.

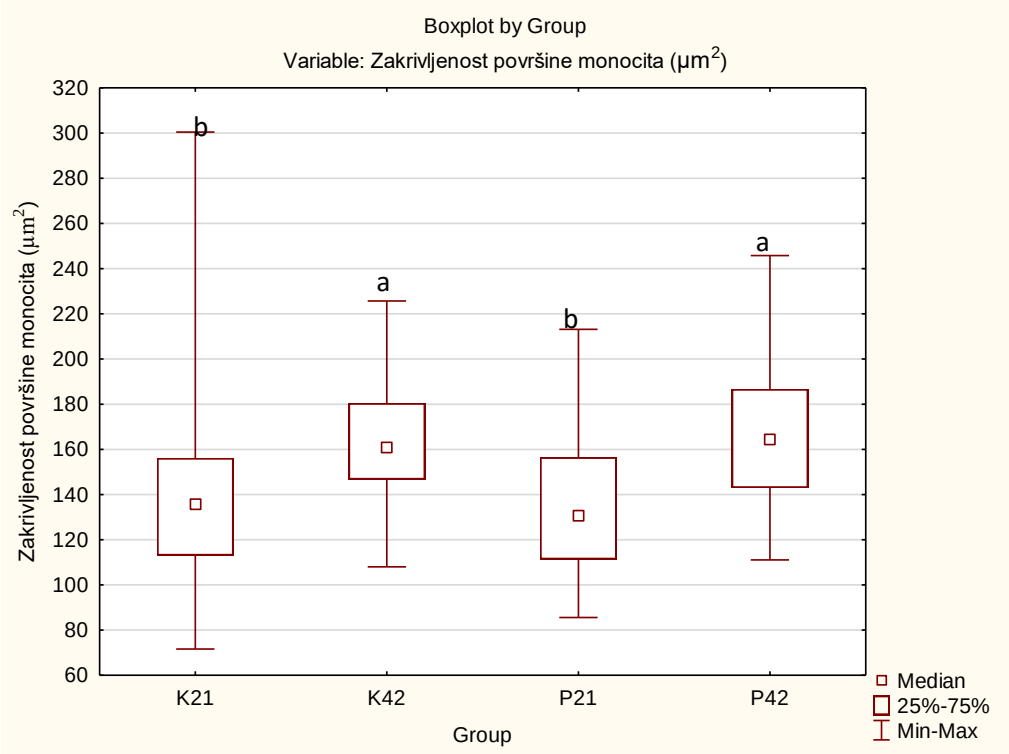


Slika 7. Površina monocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.

Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Promjene vrijednosti površine monocita prikazane su na slici 7. Uočava se njen porast u kontrolnoj i pokusnoj skupini 42. dana tova s obzirom na kontrolu 21. dana, a isto tako porast je zabilježen i pokusnoj skupini 42. dana u odnosu na pokusnu 21. dana. Uspoređujući obje kontrolne sa pokusnim skupinama pilića (K21:P21, K42:P42) nema promjena vrijednosti za navedenu varijablu.



Slika 8. Zakrivljenost površine monocita u krvi kontrolnih i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita.

K = kontrolne skupine; P = pokusne skupine pilića 21. i 42. dana tova.
Značajne razlike između skupina označene su različitim slovima.

Kretanje vrijednosti zakrivljenosti površine monocita prikazano je na slici 8. Uočava se njen porast u kontrolnoj i pokusnoj skupini 42. dana tova s obzirom na kontrolu 21. dana, a isto tako porast je zabilježen i pokusnoj skupini 42. dana u odnosu na pokusnu 21. dana. Uspoređujući obje kontrolne sa pokusnim skupinama pilića (K21:P21, K42:P42) nema promjena vrijednosti za navedenu varijablu.

Tablica 1. **Morfometrijski pokazatelji eritrocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita.**

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.
K = kontrolne skupine; P = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

	POKAZATELJ	K 21	K 42	P 21	P 42
STANICA N= 2940	**Površina (µm²)**	57,87[a] 53,83-62,39	51,99[c] 47,68-55,74	56,68[b] 52,49-61,30	57,80[a] 53,65-62,21
	Opseg (µm)	30,01[a] 28,90-31,31	28,63[c] 27,50-29,82	29,65[b] 28,40-31,05	29,80[b] 28,47-31,14
	Minimalni polumjer (µm)	3,20[b] 2,98-3,40	2,92[d] 2,71-3,13	3,16[c] 2,96-3,33	3,27[a] 2,96-3,54
	Maksimalni polumjer (µm)	5,61[a] 5,32-9,93	5,50[b] 5,15-5,79	5,58[a] 5,23-5,96	5,48[b] 5,01-5,88
	Zakrivljenost površine (µm²)	58,76[a] 54,76-63,43	52,79[c] 48,45-56,64	57,46[b] 53,23-62,02	58,88[a] 54,67-63,27
	Dužina (µm)	11,00[a] 10,42-11,65	10,75[b] 10,04-11,33	10,92[a] 10,26-11,70	10,64[c] 9,68-11,45
	Širina (µm)	6,87[b] 6,50-7,28	6,30[d] 5,90-6,76	6,73[c] 6,31-7,09	7,25[a] 6,65-7,70
JEZGRA N= 2940	**Površina (µm²)**	11,79[a] 10,93-12,73	10,97[c] 10,19-11,86	11,05[b] 10,24-11,87	11,70[a] 10,87-12,51
	Opseg (µm)	13,40[a] 12,88-13,99	12,83[d] 12,29-13,44	12,99[c] 12,43-13,57	13,23[b] 12,68-13,77
	Minimalni polumjer (µm)	1,42[b] 1,29-1,52	1,41[b] 1,33-1,50	1,36[c] 1,26-1,48	1,47[a] 1,36-1,55
	Maksimalni polumjer (µm)	2,46[a] 2,34-2,63	2,31[c] 2,17-2,45	2,39[a] 2,25-2,55	2,35[bc] 2,23-2,48
	Zakrivljenost površine (µm²)	11,95[a] 11,15-13,00	11,20[c] 10,40-12,12	11,25[b] 10,45-12,14	11,94[a] 11,10-12,84
	Dužina (µm)	4,79[a] 4,52-5,09	4,46[d] 4,19-4,73	4,62[b] 4,34-4,92	4,53[c] 4,29-4,78
	Širina (µm)	3,17[b] 2,91-3,38	3,16[b] 2,97-3,36	3,06[c] 2,81-3,28	3,33[a] 3,13-3,51
	Odnos jezgra/citoplazma	0,20[b] 0,19-0,22	0,21[a] 0,19-0,23	0,19[c] 0,18-0,21	0,20[b] 0,18-0,22

Tablica 2. **Morfometrijski pokazatelji limfocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita.**

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.
K = kontrolne skupine; P = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

	POKAZATELJ	K 21	K 42	P 21	P 42
STANICA N= 2781	**Površina (µm²)**	49,60^{c} 42,25-58,56	65,60^{a} 53,76-75,99	58,29^{b} 48,37-70,61	58,95^{b} 51,27-69,05
	Opseg (µm)	27,95^{c} 25,50-31,16	32,66^{a} 29,46-35,50	31,48^{ab} 28,78-34,90	32,16^{a} 29,08-32,16
	Minimalni polumjer (µm)	3,35^{d} 3,03-3,64	3,61^{a} 3,29-4,0	3,45^{b} 3,12-3,86	3,44^{bc} 3,11-3,73
	Maksimalni polumjer (µm)	4,71^{d} 4,21-5,34	5,55^{a} 4,98-6,13	5,29^{c} 4,71-5,29	5,44^{ab} 4,85-6,18
	Zakrivljenost površine (µm²)	51,16^{d} 43,86-60,85	68,41^{a} 55,93-80,07	61,37^{c} 51,74-74,34	63,29^{bc} 53,94-74,91
	Dužina (µm)	8,85^{c} 7,96-9,93	10,43^{a} 9,21-11,41	9,80^{b} 8,78-10,97	10,01^{ab} 9,14-11,22
	Širina (µm)	7,64^{c} 7,00-8,37	8,63^{a} 7,83-9,36	8,32^{b} 7,58-9,18	8,40^{ab} 7,76-9,20
JEZGRA N= 2781	**Površina (µm²)**	31,81^{d} 28,91-35,59	39,72^{a} 31,75-47,72	33,90^{bc} 29,27-37,59	33,01^{b} 29,43-37,64
	Opseg (µm)	22,39^{c} 21,03-23,90	25,23^{a} 22,41-27,77	23,88^{b} 22,31-26,38	22,70^{ab} 21,17-24,52
	Minimalni polumjer (µm)	2,53^{c} 2,31-2,73	2,81^{a} 2,51-3,13	2,52^{bd} 2,10-2,76	2,61^{b} 2,45-2,78
	Maksimalni polumjer (µm)	3,74^{c} 3,51-4,05	4,33^{a} 3,79-4,71	4,04^{b} 3,75-4,38	3,91^{a} 3,57-4,34
	Zakrivljenost površine (µm²)	33,08^{c} 25,42-37,04	41,16^{a} 32,72-49,53	36,00^{b} 31,32-40,49	34,02^{b} 30,49-38,37
	Dužina (µm)	7,12^{c} 6,64-7,70	8,14^{a} 7,10-8,87	7,65^{b} 7,00-8,29	7,40^{ab} 6,81-8,19
	Širina (µm)	5,96^{c} 5,57-6,36	6,56^{a} 5,90-7,32	6,05^{b} 5,58-6,49	5,92^{ab} 5,56-6,36
	Odnos jezgra/citoplazma	0,65^{a} 0,59-0,71	0,61^{b} 0,56-0,68	0,59^{c} 0,50-0,66	0,56^{d} 0,51-0,61

Tablica 3. **Morfometrijski pokazatelji monocita kontrolne skupine i pokusnih skupina pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita.**

Podaci su prikazani kao medijan, te donji i gornji kvartil. Značajne razlike u istom redu označene su različitim slovima u eksponentu.
K = kontrolne skupine; P = skupine pilića hranjenih uz dodatak eteričnih ulja XTRACT™ i prirodnog zeolita 21. i 42. dana tova.

	POKAZATELJ	K 21	K 42	P 21	P 42
STANICA N= 570	**Površina (µm²)**	127,40[b] 107,70-147,53	151,80[a] 137,26-165,8	125,27[b] 104,14-145,33	151,33[a] 134,28-165,04
	Opseg (µm)	47,17[b] 42,70-51,64	51,63[a] 48,30-55,92	46,60[b] 43,47-50,20	52,58[a] 48,50-57,33
	Minimalni polumjer (µm)	5,43[b] 5,02-5,82	5,50[b] 5,20-5,89	5,28[b] 4,83-5,83	5,61[ab] 5,22-5,92
	Maksimalni polumjer (µm)	7,62[b] 6,90-8,28	8,59[a] 8,00-9,51	7,61[b] 6,78-8,15	8,66[a] 7,92-9,60
	Zakrivljenost površine (µm²)	135,76[b] 113,00-156,16	160,88[a] 146,98-180,42	130,54[b] 111,30-156,50	164,27[a] 142,97-186,69
	Dužina (µm)	14,08[b] 12,79-15,33	15,92[a] 14,92-17,40	14,27[b] 12,86-15,56	16,06[a] 14,61-17,37
	Širina (µm)	12,72[b] 11,60-13,80	13,69[a] 12,80-14,49	12,43[b] 11,60-13,80	13,81[a] 12,89-15,02
JEZGRA N= 570	**Površina (µm²)**	55,65[b] 50,88-63,29	59,87[a] 53,74-69,67	56,63[ab] 49,22-62,45	59,16[a] 53,64-65,28
	Opseg (µm)	36,78 32,09-40,81	35,96 32,99-41,34	35,31 32,11-40,67	36,16 32,50-42,46
	Minimalni polumjer (µm)	2,27 1,66-2,81	2,44 1,88-2,92	2,49 1,52-2,93	2,36 1,79-2,85
	Maksimalni polumjer (µm)	5,99[b] 5,48-6,45	6,37[a] 5,73-7,38	6,04[ab] 5,40-6,65	6,25[a] 5,69-7,15
	Zakrivljenost površine (µm²)	64,39[b] 57,26-74,41	71,55[a] 60,17-84,86	64,21[ab] 58,49-75,79	67,70[ab] 60,11-82,57
	Dužina (µm)	10,92[b] 10,24-11,82	11,78[a] 10,70-13,26	11,22[ab] 10,22-12,16	11,51[a] 10,38-12,69
	Širina (µm)	7,92 7,13-8,79	8,08 7,25-9,01	7,71 7,10-8,60	8,11 7,16-8,95
	Odnos jezgra/citoplazma	0,44[b] 0,42-0,49	0,41[c] 0,36-0,46	0,44[ab] 0,41-0,49	0,40[c] 0,36-0,43

5. RASPRAVA

Intenzivan tov pilića najzastupljeniji je način uzgoja peradi koji vrlo često, zbog povećane izloženosti stresu, dovodi do slabljenja imunosnog odgovora i pojave metaboličkih bolesti (Hengl, 2012.). Kako bi prevenirali takva stanja i ispitali imunomodulacijski i antimikrobni učinak fitogena, u hranu tovnih pilića primiješan je XTRACT^{TM} (kombinacija komponenti eteričnih ulja karvakrola, cinamaldehida i kapsaicina) i prirodni zeolit klinoptilolit. U brojlera, eterična ulja koja se koriste kao dodaci hrani za životinje, potiču aktivnost tripsina i amilaze (Lee, 2002.) te stimuliraju crijevnu mukoznu sekreciju za koju se smatra da utječe na adheziju patogena, a samim tim i na stabilizaciju mikrobne eubioze u crijevima životinja (Jamroz i sur., 2006). Hernandez i sur. (2004.) navode poboljšanu probavljivost hrane u brojlera prilikom korištenja mješavine komponenti eteričnih ulja karvakrola, cinamaldehida i kapsaicina. Kao posljedica njihove antimikrobne aktivnosti javlja se i smanjivanje imunosnog obrambenog stresa u kritičnim fazama proizvodnje životinja (Windisch i sur., 2007.).

Eterična ulja koja imaju visoki postotak fenolnih komponenti kao što je primjerice karvakrol, mogu ostvariti najbolji antibakterijski utjecaj na patogene u hrani (Burt, 2004.). Prema brojnim istraživanja navodi se antimikrobna aktivnost karvakrola koja se temelji na svojstvu hidrofobnosti i povećavanju propusnosti stanične membrane bakterija (Helander i sur., 1998.; Burt, 2004.). Iako drukčijim mehanizmom djelovanja, antimikrobna aktivnost ne izostaje ni kod cinamaldehida, čime se objašnjava njegova uloga u održavanju balansa crijevne mikroflore (Lee i Ahn, 1998.). Eterična ulja cimeta imaju brojna pozitivna djelovanja kao primjerice antioksidacijsko, adstrigentno, antiseptično, antivirusno i protugljivično djelovanje (Faix i sur., 2009.). Antioksidacijska sposobnost dokazana je aktivacijom antioksidacijskih enzima u plazmi i eritrocitima, što dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije i posljedično sprječavanja oksidacijskog oštećenja stanica (Faix i sur., 2009.). Nadalje, ustanovljena je veća fagocitna aktivnost i indeks fagocitoze makrofaga (Dhuley, 1997.). Analgetsko i protuupalno djelovanje je svojstveno kapsaicinu, uz antimikrobni učinak (Caterina i sur., 1997.) i protektivno djelovanje na sluznicu želuca (Gonzalez i sur., 1998.). U peradi je dokazano da povećava apetit, čemu pridonosi činjenica da ptice zbog nedostatka specifičnih receptora za vezanje kapsaicina ili zbog njihove neosjetljivosti ne mogu osjetiti učinak ljutih začina (Mason i Maruniak, 1983.).

Zeoliti se često upotrebljavaju kao adsorbensi plinova osobito amonijaka, za uklanjanje neugodnih mirisa iz nastambi, te smanjenje vlažnosti i kontrolu kvalitete stelje (Eleroğlu i Yalçın, 2005.; Karamanlis i sur., 2008.; Hengl, 2012.). Korišteni kao dodatak hrani imaju sposobnost adsorpcije mikotoksina i teških metala iz hrane, te na taj način smanjuju njezino štetno djelovanje i poboljšavaju okus, što indirektno utječe na povećanje njezine konzumacije (Šperanda i sur., 2006.).

U procjeni kvalitete i prikladnosti hrane za farmske životinje Maxwell i sur. (1990.) navode važnost određivanja krvnih parametara. Osim toga krvni parametri su bitni pokazatelji fiziološkog, patološkog i nutritivnog stanja organizma, a njihove promjene se mogu koristiti u procjeni metaboličkog statusa životinje (Babatunde i sur., 1992.).

Volumen stanice je važna fiziološka značajka na koju utječu osmolarnost, migracijski procesi, stanični rast i metabolička regulacija. Čak i kratkotrajne promjene volumena mogu uzrokovati prilično znatne promjene funkcije stanice, dok velika kolebanja volumena mogu narušiti cjelovitost membrane i arhitekturu citoskeleta (Wehner i sur., 2003.). Danas se smatra da morfometrijske karakteristike eritrocita koreliraju s dijagnostičkim pokazateljima kao npr. za koronarnu insuficijenciju u ljudi (Alexandratou i sur. 1999.), dok je u pasa istražen hemoragični šok koji također dovodi do morfometrijskih promjena eritrocita (Berezina i sur., 2001.). Stoga su u ovom istraživanju istražene promjene morfologije stanica i jezgri eritrocita, limfocita i monocita preciznim mjerenjem morfometrijskih pokazatelja 21. i 42. dana tova i to u kontrolnoj skupini i pokusnoj skupini životnija kojoj su u hranu dodana eterična ulja karvakrola, cinamaldehida i kapsaicina te prirodni zeolit klinoptilolit.

Analiza morfometrijskih značajki eritrocita utvrdila je značajno smanjenje većine mjerenih varijabli u pokusnoj skupini 21. dana tova u odnosu na kontrolnu skupinu, da bi 42. dana bio vidljiv njihov značajan porast naspram kontrolne skupine 42. dana. Buslovskaya i sur. (2013.) nalaze smanjenje površine eritrocita tijekom stresa uzrokovanog okolišnim čimbenicima, kao što su neodgovarajuće držanje i hranidba. Wehner i sur. (2003.) navode da promjene morfometrijskih značajki eritrocita mogu biti posljedica konformacijske preraspodjele hemoglobina i njegovog pozicioniranja u sredinu stanice, a takve promjene su važno obilježje adaptacijskih procesa i mogu utjecati na respiratornu funkciju krvi te predstavljaju stanične mehanizme prilagodbe. Stoga, skloni smo početno smanjenje eritrocitnih varijabli tumačiti kao odgovor stanica na mogući stres uzrokovan dodatkom eteričnih ulja i klinoptilolita u hranu, uz

samu činjenicu da je već i intenzivan tov i načini njegova provođenja dodatno opterećenje za organizam. Povećanje navedenih varijabli 42. dana tova upućuje da su pilići nakon početne reakcije na stres reagirali intenzivnom eritropoezom koja se očitovala povećanjem stanica, njihovom povećanom nepravilnošću. Prema mnogim istraživanjima flavonoidi odnosno fenolne komponente koje su važan sastojak eteričnih ulja, ali i mnogih drugih biljaka stimuliraju eritropoetin, faktor rasta koji regulira eritropoezu stimulacijom proliferacije i diferencijacije nezrelih stanica eritrocitnog reda (Zheng i sur., 2011.) Stoga povećan opseg eritropoeze u ovom istraživanju može se smatrati posljedicom djelovanja fenolnih komponenti eteričnih ulja. Isto tako, pretpostavku da su pokusne životinje 21. dana tova bile izložene stresu potkrjepljuje podatak o odnosu heterofila i limfocita (H/L) u krvi. Limfopenija uz istovremenu heterofiliju su karakteristična obilježja stresnog leukograma. 21. dana istraživanja H/L omjer iznosio je 1,74, naspram kontrole čiji je omjer bio 0,57, da bi se 42. dana tova omjer smanjio na 0,64 (Hengl, 2012.). Vraćanje H/L omjera 42. dana prema kontrolnim vrijednostima podudara se sa vraćanjem površine eritrocita i jezgre na kontrolne vrijednosti, što nas upućuje na zaključak da su pilići prevladali početni stresni učinak neuobičajenih dodataka u hrani. Osim toga, promjene dužine i širine eritrocita, 21. dana eritrociti su bili značajno uži, dok su 42. dana bili značajno kraći i širi u odnosu na kontrolu, upućuju na suptilne konformacijske promjene unutar eritrocita tijekom prilagodbe na početni stres.

Utvrđeno je da leukociti u životinja i ljudi u stanjima fiziološke napregnutosti organizma mijenjaju funkcionalna svojstva (Colditz, 2002.). Kako su pilići tijekom tova suočeni sa velikim metaboličkim zahtjevima i izloženi brojnim stresorima okoline, dolazi do brojnih promjena i prilagodbi u njihovom organizmu uključujući i aktivaciju komponenti nespecifične i specifične imunosne obrane organizma. Monociti imaju važnu ulogu u inicijaciji regulacije imunosnog odgovora, te u interakciji sa limfocitima djeluju kao izvršne stanice za fagocitozu i ubijanje patogena (Albercht, 1979.; Kende, 1982.). Stoga su nas zanimale promjene morfometrijskih pokazatelja limfocita i monocita s obzirom na imunomodulacijska i antioksidacijska svojstva pojedinih komponenti u kombinaciji esencijalnih ulja i prirodnog zeolita koji su bili primiješani u hranu pilića tijekom tova.

Analizom morfometrijskih pokazatelja limfocita utvrđeno je značajno povećanje svih mjerenih varijabli u pokusnoj skupini 21. dana kao i kontrolnoj 42. dana tova u odnosu na kontrolu 21. dana. Kardum i sur. (2011.; 2011.a) utvrdili su da se razvoj imunosnog odgovora na

cijepljenje, a time pojačana aktivnost limfocita, očituje morfološkim promjenama, odnosno značajnim povećanjem stanice i nepravilnošću oblika. Također, utvrđeno je da imunosni odgovor zahtjeva brz i snažan stanični rast, te su stoga nakon vakcinacije znatno povećani metabolički procesi (Maciver i sur., 2008.). Nalaz povećanja vrijednosti limfocita u pokusnoj skupini pilića već 21. dana nakon dodavanja esencijalnih ulja u obrok može ukazivati na bržu i pojačanu aktivnost limfocita uslijed imunomodulacijskog učinka dodanih fitobiotika dok je u kontrolnim skupinama navedeni porast uočljiv tek 42. dana. Za razliku od toga, ne promijenjene vrijednosti limfocita u pokusnoj skupini 42. dana naspram istovremene kontrole, odnosno čak i smanjenje pojedinih morfometrijskih pokazatelja kao što su površina, zakrivljenost površine i minimalni polumjer stanice te smanjenje svih mjerenih varijabli jezgre stanice može se pripisati protuupalnom i antimikrobnom učinku komponenti eteričnog ulja XTRACT^{TM}. Navedenom protuupalnom i antimikrobnom učinku također se mogu pripisati i izmjerene vrijednosti monocita, pri čemu u objema skupinama 21. dana tova nisu uočene promjene da bi značajan porast bio uočen tek 42. dana u pokusnoj skupini ali svega na razinu kontrole istoga dana. Sličnu dinamiku promjena pokazuje i odnos jezgre i citoplazme (N/C) za limfocite i monocite. Značajno smanjenje N/C omjera u pilića hranjenih dodatkom eteričnih ulja, za limfocite 21. i 42. dana te za monocite 42. dana, upućuje na to da su obje vrste stanica imale obilniju citoplazmu u odnosu na kontrolnu skupinu. Takav nalaz može uputiti na pojačanu aktivnost limfocita i monocita uslijed imunomodulacijskog učinka dodanih esencijalnih ulja. Ovakvi rezultati podudaraju se sa brojnim istraživanjima koja navode imunomodulacijsko djelovanje eteričnih ulja (Dhuley, 1997.; Kirkpinar i sur., 2010.). Također, *in vitro* stimulacija limfocita dovela je do brojnih složenih bioloških procesa koji su rezultirali povećanom sintezom pojedinih staničnih proteina (Hall i sur., 1984.). Nasuprot tome, zaostajanje vrijednosti morfometrijskih pokazatelja leukocita 42. dana istraživanja u pokusnoj skupini na sličnim vrijednostima istodnevne kontrole, odnosno čak i pad određenih pokazatelja limfocita, mogu biti rezultat djelovanja zeolita kao snažnog adsorbensa te pojedinih komponenti eteričnih ulja XTRACT^{TM} sa antimikrobnim učinkom što sve doprinosi stabilizaciji crijevne mikroflore te posljedično smanjenoj potrebi za aktivacijom specifične i nespecifične obrane organizma.

6. ZAKLJUČCI

Digitalna analiza morfometrijskih pokazatelja krvnih stanica pruža uvid u suptilne promjene konformacije same stanice kao i njezinih odjeljaka nedostupnih vizualnom pregledu.

Prikazani rezultati analize morfometrijskih pokazatelja eritrocita, leukocita i monocita u kontrolne skupine i skupine pilića kojima su u hranu dodani fitogeni pripravci sa antioksidativnim i imunomodulacijskim učinkom potvrđuju njen značaj u procjeni adaptivnih odgovora krvnih stanica na stresne čimbenike tijekom intenzivnog tova.

Dobiveni rezultati također potvrđuju imunomodulacijski učinak eteričnih ulja XTRACT^{TM} dodanih u hranu pilića.

Njihovom primjenom potiče se imunosna kompetencija koja se očitovala nepravilnošću i značajnim povećanjem limfocita i monocita.

Postignuti rezultati mogu biti od koristi u promicanju učinkovitih metoda za procjenu imunokompetencije organizma te dijagnosticiranje i prevenciju stresnih stanja.

7. POPIS LITERATURE

ALBERCHT, R. M. (1979): Macrophages in the immune response. In: Immunologic tolerance and macrophage function. (Baram, P., J. Battisto, C. Pierce Eds.), Elsevier, Amsterdam, 81-91.

ALEXANDRATOU, E., D. YOVA, D. V. COKKINOS. (1999): Morphometric characteristics of red blood cells as diagnostic factors for coronary artery disease. Clin. Hemorheol. Micro. 21, 383-388.

BAAK, J. P. A. (1985): The principles and advances of quantitative pathology. Anal. Quant. Cytol. Histol. 9, 89-95.

BABATUNDE, G. M., A. O. FAJIMI, A. O. OYEJIDE (1992): Rubber seed oil versus palm oil in broiler chicken diets. Effects on performance, nutrient digestibility, haematology and carcass characteristics. Anim. Feed Sci. Tech. 35, 133-146.

BEREZINA, T. L., S. B. ZAETS, V. L. KOZHURA, I. S. NOVODERZHKINA, A. K. KIRSANOVA, E. A. DEITCH, G. W. MACHIEDO (2001): Morphologic changes of red blood cells during hemorrhagic shock replicate changes of aging. Shock 15, 467-470.

BURT, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223–253.

BUSLOVSKAYA, L. K., E. Y. BELYAEVA, A. Y. KOVTUNENKO (2013): Adaptive dynamics of blood cell parameters in hens upon change sin the lighting conditions. Global Veterinaria 11 (4): 441-445.

CATERINA, M. C., M. A. SCHUMACHER, M. TOMINAGA, A. T. ROSEN, J. D. LEVINE, D. JULIUS (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389, 816-824.

COLDITZ, I. G. (2002): Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. Livest. Prod. Sci. 75, 257–268.

CROCKER, J., E. L. JONES, R. C. CURRAN (1983): A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. J. Clin. Pathol. 36, 298-302.

CROCKER, J., E. L. JONES, R. C. CURRAN (1983a): The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non- Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. J. Clin. Pathol. 36, 303-306.

DHULEY, J. N. (1997): Effects of some Indian herbs on macrophage functions in ochratoxin-A treated mice. J. Ethnopharmacol 58: 15-20.

ELEROĞLU, H., H. YALÇIN (2005): Use of natural zeolite-supplemented litter increased broiler production. S. Afr. J. Anim. Sci. 35(2): 90-97.

FAIX, Š., Z. FAIXOVÁ, I. PLACHÁ, J. KOPPEL (2009): Effect of Cinnamomum zeylanicum essential oil on antioxidative status in broiler chickens. Acta Vet. Brno 2009, 78: 411-417.

GONZALEZ, R., R. DUNKEL, B. KOLETZKO, V. SCHUSDZIARRA, H. D. ALLESCHER, (1998): Effect of capsaicin containing red pepper sauce suspension on upper gastrointestinal motility in healthy volunteers. Digest. Dis. Sci. 43 (6): 1165-1171.

HALL, D. J., J. J. O'LEARY, A. ROSENBERG (1984): Early synthesis of specific cytoplasm proteins is correlated with the rate of exit of lymphocytes from the resting state. J. Cell Biol. 99, 1814-1821.

HASHEMI, S. R., H. DAVOODI (2010): Phytogenetic as a new additive in poultry industry. J. Anim. Vet. Adv. 9(17): 2295-2304.

HELANDER, I. M., H.-L. ALAKOMI, K. LATVA-KALA, T. MATTILA-SANDHOLM, I. POL, E. J. SMID, L. G. M GORRIS, A. V. WRIGHT (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agr. Food Chem. 9: 3590–3595.

HENGL, B. (2012): Utjecaj eteričnih ulja i prirodnog zeolita na proizvodne i zdravstvene pokazatelje pilića te mikrobiološku ispravnost pilećeg mesa. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni Fakultet u Osijeku, Osijek, Republika Hrvatska.

HERNANDEZ, F., MADRID, J., GARCIA, V., ORENGO, J., MEGIAS, M.D. (2004): Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poultry Science. 2: 169-174.

JAMROZ, D., WERTELECKI, T., HOUSZKA, M., KAMEL, C. (2006): Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 90: 255-268.

KARAMANLIS, X., P. FORTOMARIS, G. ARSENOS, I. DOSIS, D. PAPAIOANNOU, C. BATZIOS, A. KAMARIANOS (2008): The effect of a natural zeolite (clinoptilolite) on the performance of broiler chickens and the quality of their litter. Asian Austral. J. Anim. 21 (11): 1642-1650.

KARDUM, M., N. POLJIČAK- MILAS, Ž. GOTTSTEIN, S. MILINKOVIĆ- TUR., I. KARDUM-SKELIN, I. CIGLAR-GROZDANIĆ, H. MAZIJA (2011): Morfometrijske značajke limfocita pilića cijepljenih protiv Marekove bolesti sojem HVT FC 126 postupkom nebulizacije. 9. simpozij Peradarski dani 2011. s međunarodnim sudjelovanjem, 11.-14. Svibnja, Šibenik, Hrvatska, 40-47.

KARDUM, M., N. POLJIČAK- MILAS, Ž. GOTTSTEIN, S. MILINKOVIĆ- TUR., I. KARDUM-SKELIN, I. CIGLAR-GROZDANIĆ, H. MAZIJA (2011a): Morphological characteristics of chicken lymphocytes vaccinated against Marek's disease using HVT FC 126 by means of nebulization and parenteral vaccination. Abstracts ot the 36th European Congress of Cytology, 22-25 September, 2011, Istanbul, Turkey, 138-139.

KENDE, M. (1982): Role of macrophages in the expression of immune responses. J. Am. Vet. Med. Ass. 181: 1037-1042.

KIRKPINAR, F., H. B. ÜNLÜ, G. ÖZDEMIR (2010): Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcase, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. Livest. Sci. 137(1-3): 219-225.

LAWRENCE, B. M., R. J. REYNOLDS (1984): Progress in essential oils. P & F. 9: 23-31.

LEE, H.-S., Y.-J. AHN (1998): Growth-Inhibiting Effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. J. Agr. Food Chem. 46: 8-12.

LEE, K. W. (2002): Essential oils in broiler nutrition, Utreht, The Netherlands. 2002.

MACIVER, N. J., S. R. JACOBS, H. L. WIEMAN, J. A. WOFFORD, J. L. COLOFF, J. C. RATHMELL (2008): Glucose metabolism in lymhocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. J. Leukoc. Biol. 84, 949-957.

MASON, J. R., J. A. MARUNIAK (1983): Behavioral and physiological effects of capsaicin in red winged blackbirds. Pharmacol. Biochem. Beha. 19: 857-862.

MAXWELL, M. H., W. ROBERTSON, S. SPENER, C. C. MACLORQUODALE (1990): Comparison of haematological parameters in restricted and ad libitum fed domestic fowls. Brit. Poultry Sci. 31, 407-413.

MURATA, S. I., K. MOCHIZUKI, T. NAKAZAWA, T. KONDO, N. NAKAMURA, H. YAMASHITA, Y. URATA, T. ASHIBARA, R. KATOH (2003): Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. Microsc. Res. Tech. 61, 457-462.

NAMYSLOWSKI, G., W. SCIERSKI, J. K. NOZYŃSKI, E. ZEMBALA-NOZYŃSKA (2004): Morphometric characteristics of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer. Med. Sci. Monit. 10, 241-245.

OBERHOLZER, M., H. CHRISTEN, R. ETTLIN, M. BUSER, M. OESTRECHER, R. GSCHWIND (1991): Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstated on simple, multipurpose analysis system. Anal. Quant. Cytol. Histol. 13, 316-320.

POST, J., J. REBEL, A. HUURNE (2003): Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. Poultry Sci. 82: 1313-1318.

RENAUDEAU, D., A. COLLIN, S. YAHAV (2012): Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. Animal, 6: 707-728.

ŠPERANDA, T., V. ŠERIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, Đ. SENČIĆ, D. GRGURIĆ, Z. STEINER (2006): Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. Acta Vet.- Beograd. 56(2-3): 121-136.

WEHNER, F., H. OLSEN, H., TINEL, E. RINNE-SAFFRAN, R. K. YH. RINNE. (2003): Ńell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol, 148: 1-80.

WINDISCH, W., K. SCHELDE, C. PLITZNER, A. KROISMAYR (2007): Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J. Anim. Sci. 86: 140-148.

YANG, Y., P. A. IJI, M. CHOCT (2009): Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review oft he role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. World Poultry Sci. J. 65: 97-114.

ZHENG, K. Y. Z., C. Y. R. CHOI , A. W. H. CHEUNG, A. J. Y. GUO, C. W. C. BI, K. Y. ZHU,Q. FU, Y. DU, W. L. ZHANG, J. Y. X. ZHAN, R. DUAN, D. T. W. LAU, T. T. X. DONG, K. W. K. TSIM (2011): Flavonoids from Radix Astragali Induce the Expression of Erythropoietin in Cultured Cells: A Signaling Mediated via the Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1α. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 1697–1704.

8. SAŽETAK

UTJECAJ ETERIČNIH ULJA XTRACT^{TM} I PRIRODNOG ZEOLITA NA MORFOMETRIJSKE POKAZATELJE KRVNIH STANICA

U ovom istraživanju izmjerene su promjene morfologije stanica i jezgri eritrocita, limfocita i monocita u kontrolne i pokusne skupine životinja 21. i 42. dana tova kojoj su u hranu dodana eterična ulja XTRACT^{TM} i prirodni zeolit. Morfometrija stanica krvi napravljena je na osobnom računalu s podržavajućim programom "SFORM" tvrtke VAMSTEC, Zagreb, te je analizirano ukupno 36 krvnih razmaza. Statistička obrada rezultata izvršena je uz pomoć kompjuterskog programa za analizu podataka STATISTIKA, 12. Digitalna analiza morfometrijskih pokazatelja pokazala je da se veličina eritrocita značajno smanjila 21. dana u odnosu na kontrolu, dok su 42. dana vrijednosti ponovno porasle na razinu kontrolne skupine. Zabilježena je povećana nepravilnost oblika i povećanje veličine limfocita 21. dana, koji su i 42. dana ostali povećani. Povećanje veličine i nepravilnosti oblika monocita nastupio je tek 42. dana. Rezultati analize morfometrijskih pokazatelja eritrocita, leukocita i monocita potvrdili su njen značaj u procjeni adaptivnih odgovora krvnih stanica na stresne čimbenike tijekom intenzivnog tova. Rezultati također potvrđuju imunomodulacijski učinak eteričnih ulja dodanih u hranu pilića, što se očitovalo statistički značajnim razlikama nađenim u svim istraživanim varijablama stanica i jezgri limfocita i monocita: površini, opsegu, minimalnom i maksimalnom radijusu, zakrivljenosti, dužini i širini. Postignuti rezultati mogu biti od koristi u promicanju učinkovitih metoda za procjenu imunokompetencije organizma te dijagnosticiranje i prevenciju stresnih stanja pri intenzivnom tovu pilića.

KLJUČNE RIJEČI: eterična ulja, morfometrija eritrocita, limfocita i monocita, imunomodulacijsko djelovanje.

9. SUMMARY

EFFECTS OF ESSENTIAL OILS XTRACT^{TM} AND NATURAL ZEOLITE ON MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS

The aim of this research was to investigate the effects of essential oils XTRACT^{TM} and natural zeolite on blood cells morphology. The changes in the appearance of cells and nucleus of erythrocytes, lymphocytes and monocytes were measured in the control and experimental group, on the 21st and on the 42nd day of fattening. Image analysis was performed using the SFORM software (VAMSTEC, Zagreb, Croatia). A total of 36 blood smears were analyzed. Statistical data analysis was performed by use of the Statistica, 12. On the 21st day the size of erythrocytes was significantly lower compared to the control group, but on the 42nd day values returned back to usual. The changes in lymphocytes shape and size were seen on the 21st day of fattening. Their increased size and irregular shape remained the same on the 42nd day. The size of monocytes did not change until the 42nd day, after which they were significantly larger compared to the control group. Results of analysis of morphometric characteristics of erythrocytes, leukocytes and monocytes confirmed its importance in evaluation of the blood cells' adaptive responses to stress factors during intensive fattening. The results show morphological characteristics of cell's transformation in all examined variables of monocytes and lymphocytes as well as their nuclei: area, outline, minimal and maximal radius, convexity of area, length and breadth, whereby immunomodulatory effects of essential oils added in chicken's food are confirmed. The obtained results can be used to promote effective methods for assessment of immune competence of the organism so far as the diagnosis and prevention of stress condition in intensive chicken fattening.

KEY WORDS: essential oils, erythrocyte, lymphocyte and monocyte morphometry, immunomodulatory effect.

10. ŽIVOTOPIS

Klara Tomas

Rođena sam 5. ožujka 1991. godine u Požegi. Osnovnu školu Julija Kempfa završila sam 2005. godine također u Požegi kao i Gimnaziju Požega 2009. godine, smjer prirodoslovno-matematički. Iste godine upisala sam integrirani prediplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Apsolventica sam postala 2015. godine s prosjekom ocjena 4,474.

Bila sam demonstratorica na Zavodu za kemiju i biokemiju kao i na Zavodu za patološku fiziologiju. Također, tijekom fakultetskog obrazovanja aktivno sam sudjelovala u znanstveno-istraživačkom radu. Pod vodstvom dr. sc. Jelene Šuran 2013. godine napisala sam studentski rad „Učinak pentadekapeptida BPC 157 na funkcionalno-motoričke sposobnosti štakora" čije je istraživanje provedeno na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rezultate svog istraživanja predstavila sam na 9. međunarodnom znanstvenom kongresu studenata i mladih znanstvenika biomedicinskog područja, CROSS-u i na simpoziju gastroenterološke sekcije Međunarodne unije za bazičnu i kliničku farmakologiju (IUPHAR GI Section) na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine, za navedeni rad kao i za marljivost i ostvarenje uzornih rezultata u studiranju, nagrađena sam Dekanovom nagradom.

Godine 2014. dodijeljena mi je Rektorova nagrada za studentski rad ″Utjecaj eteričnih ulja XTRACT^{TM} i prirodnog zeolita na morfometrijske pokazatelje krvnih stanica″ koji je izrađen na Zavodu za patološku fiziologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Nine Poljičak Milas te znanstvenog novaka Matka Karduma, dr. med. vet. Rezultate ovog istraživanja predstavila sam 2015. godine na 6. međunarodnom kongresu Veterinarska znanost i struka.

Dobitnica sam i Posebne Rektorove nagrade kao aktivan član Akademskog zbora ″Ab ovo″. Stipendistica sam Genere d.d. od 2014. godine. Stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici Požega.