Oksidacijska stabilnost mlijeka krava i koza nakon intramamarne aplikacije propolisa

Hrdžić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:178:905260

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

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

S V E U Č I L I Š T E U Z A G R E B U

VETERINARSKI FAKULTET

Ana Hrdžić

Oksidacijska stabilnost mlijeka krava i koza nakon intramamarne aplikacije propolisa

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Zavod za fiziologiju i radiobiologiju

Predstojnik zavoda: prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Aladrović

dr. sc. Lada Radin, dr. med. vet.

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada :

1. izv. prof. dr. sc. Antun Kostelić
2. dr. sc. Lada Radin, dr. med. vet.
3. izv. prof. dr. sc. Jasna Aladrović
4. doc. dr. sc. Jelena Šuran (zamjena)

Zahvala

Posebno se zahvaljujem mentoricama izv. prof. dr. sc. Jasna Aladrović i dr. sc. Lada Radin na izboru teme i velikoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Ana

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 2
3. MATERIJALI I METODE 7
3.1. ŽIVOTINJE 7
3.2. ANALIZA PRIPRAVKA NATIVNOG PROPOLISA 11
3.2.1. PROTOKOL 12
3.3. UZORKOVANJE 13
3.3.1. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZE 13
3.4. BIOKEMIJSKE PRETRAGE 14
3.4.1. AKTIVNOSTI ENZIMA GLUTATION PEROKSIDAZE (GSH-PX) 14
3.4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) 14
3.4.3. KONCENTRACIJA REAKTIVNIH KISIKOVIH METABOLITA 14
3.4.4. BIOLOŠKI ANTIOKSIDACIJKSI POTENCIJAL (*engl. biological antioxidant potential*, BAP) 15
3.5. BROJ SOMATSKIH STANICA 15
3.6. STATISTIČKA ANALIZA 15
4. REZULTATI 17
4.1. UTJECAJ APLIKACIJE PROPOLISA NA BROJ SOMATSKIH STANICA (BSS) U UZORCIMA MLIJEKA KRAVA 26
4.2. UČINKOVITOST APLIKACIJE PROPOLISA I ANTIBIOTIKA U LIJEČENJU SUPKLINIČKOG MASTITISA KOZA 27
5. RAZMATRANJE 29
6. ZAKLJUČCI 34
7. POPIS LITERATURE 35
8. SAŽETAK 40
9. SUMMARY 41
POPIS KRATICA
POPIS TABLICA
POPIS ILUSTRACIJA
10. ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Mlijeko je normalni sekret mliječne žlijezde. Zbog svog kemijskog sastava predstavlja jednu od nezaobilaznih namirnica u prehrani ljudi. Mlijeko je prehrambena namirnica koja ima veliku nutritivnu vrijednost i kao takvo mora biti higijenski i zdravstveno ispravno. Također sadrži i sastojke koji imaju karakteristike antioksidansa koji smanjuju učinke oksidacijskog stresa kako kod mladunčadi tako i kod drugih konzumenata. Mlijeko mora poticati od zdravih, ispravno hranjenih i držanih životinja, te ne smije sadržavati patogene mikroorganizme i rezidue raznih antibiotika i antibakterijskih tvari koje se upotrebljavaju u veterinarskoj praksi (PINTIĆ i sur., 2006.).

Mliječna industrija i selekcioniranje krava na visoku mliječnost u stalnom je razvoju. Stoga je u visokoproizvodnim mliječnim stadima sve češća pojava mastitisa. Mastitis je multikauzalna bolest sekretornog dijela vimena te je obično rezultat interakcije između mikroorganizma, domaćina i okoliša (BAČIĆ i sur., 2009.). Proizvođači mlijeka trpe štete zbog gubitaka u proizvodnji, troškova liječenja i negativnog utjecaja na dobrobit životinja (NIELSEN i sur., 2010.). Liječenje i kontrola mastitisa uključuju primjenu intramamarnih antibiotskih pripravaka tijekom laktacije ili za vrijeme suhostaja (BAČIĆ, 2009.; ERSKINE i sur., 2003.; MCDOUGALL i sur., 2009.), ali zbog njihove kontinuirane i opsežne uporabe dolazi do pojave rezistencije mikroorganizama i pojave rezidua antibiotika u mlijeku. Danas se iz tog razloga sve više pridaje značaj razvoju intramamarnog pripravka koji će naći primjenu u profilaksi i terapiji mastitisa krava i koza kao alternativa i/ili nadopuna antimikrobnoj terapiji koja se rutinski primjenjuje (BRADLEY, 2002.). Jedan od mogućih pripravaka je pripravak propolisa budući da istraživanja dokazuju antibiotska, protupalna i antioksidacijska svojstva propolisa. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti utjecaj aplikacije bezalkoholne otopine propolisa primijenjene intramamarno u liječenju supkliničkih mastitisa i njegov utjecaj na antioksidacijska svojstva mlijeka krava i koza.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Mlijeko je normalni sekret mliječne žlijezde koji se dobiva redovitom i neprekidnom mužnjom, jedne ili više zdravih životinja, ispravno hranjenih i držanih, kojem nije ništa oduzeto niti dodano. Glavne komponente mlijeka su voda i suha tvar. Osnovni sastojci suhe tvari su mliječne masti, proteini ili mliječne bjelančevine te mliječni šećer tj. laktoza (BAČIĆ i sur., 2009.).

Kozje mlijeko prema osnovnom kemijskom sastavu slično je kravljem mlijeku, ali ima manje kapljice masti, više kratkih i srednje lančanih masnih kiselina od kravljeg mlijeka, zbog čega ga lipaza lakše razgradi (PARK, 2010.). Kozje mlijeko ima veću probavljivost proteina i masti, lužnatost, puferski kapacitet od kravljeg ili ljudskog mlijeka (PARK, 2010.). Kozje mlijeko u prosjeku sadrži 12,2% ukupne suhe tvari, koja se sastoje od 3,8% masti, 3,5% proteina, 4,1% laktoze i 0,8% pepela. Također ima više masti, bjelančevina i pepela, a manje laktoze od kravljeg mlijeka. Sadrži nešto manje ukupnog kazeina, ali ima više neproteinskog dušika nego kravlje mlijeko. Mlijeko koza i krava ima 3 do 4 puta veću razinu proteina i pepela, ali manje laktoze nego ljudsko mlijeko (PARK, 2010.).

Zbog svog kemijskog sastava predstavlja jednu od nezaobilaznih namirnica u prehrani ljudi. No, osim što je zdravo kao prehrambena namirnica, ono mora biti higijenski i zdravstveno ispravno te ne smije sadržavati patogene mikroorganizme i rezidue antibiotika i antibakterijskih tvari (PINTIĆ i sur., 2006.).

Zbog zahtjeva tržišta za mlijekom i mliječnim proizvodima mliječna industrija se kontinuirano razvija, a životinje se odabiru s obzirom na visoku mliječnost (OLTENACU i ALGERS, 2005.). Posljedično tomu, u visokoproizvodnim mliječnim stadima, sve je češća pojava mastitisa. Prevencija i tretman mastitisa znatan su financijski trošak za proizvođače mlijeka zbog velikih gubitaka u proizvodnji, opsežnih troškova liječenja i negativnog utjecaja na dobrobit životinja (NIELSEN i sur., 2010.).

Liječenje i kontrola mastitisa uključuju primjenu intramamarnih antibiotskih pripravaka tijekom laktacije ili za vrijeme suhostaja (BAČIĆ, 2009.; ERSKINE i sur., 2003.; MCDOUGALL i sur., 2009.), ali zbog njihove kontinuirane i opsežne uporabe dolazi do pojave rezistencije mikroorganizama.

Prema kliničkoj slici razlikujemo klinički i supklinički mastitis. Supklinički mastitis predstavlja veći zdravstveni problem na farmama visokoproizvodnih životinja, a u nekom stadu može ga biti 2 do 20 puta više nego kliničkog mastitisa (BAČIĆ i sur., 2009.). Otkrivanje supkliničkog mastitisa je otežano zbog nedostatka vanjskih vidljivih znakova, pa se u dijagnostici koristi broj somatskih stanica (BSS) i prisutnost bakterijskih uzročnika u mlijeku (BAČIĆ i sur., 2009.; RUEGG, 2009.). Nekoliko sati nakon infekcije vimena s patogenim mikroorganizmima, u mlijeku se povećava broj somatskih stanica (SCC) kao odgovor na aktivaciju upalnih procesa. Kod infekcije mliječne žlijezde, makrofagi reagiraju tako da iniciraju upalni odgovor, što prvenstveno dovodi do nakupljanja polimorfonuklearnih stanice u mlijeku. Više od 90% somatskih stanica u inficiranom vimenu čine neutrofili (ELSAMI i sur., 2015.). Epitelne stanice, stanice keratinog sloja i odumrle sekretorne stanice iz alveola čine preostalih 1 do 7% broja somatskih stanica (BAČIĆ i sur., 2009.). Broj somatskih stanica od 200 000/mL, smatra se graničnom vrijednošću u utvrđivanju zdravlja četvrti vimena (RUEGG i PANTOJA, 2013.). Zahtjevi glede broja somatskih stanica i broja mikroorganizama u mlijeku prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Razvrstavanje mlijeka u razrede prema broju mikroorganizama i somatskih stanica

Izvor: Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka NN 27/2017

Vrsta mlijeka	Razred	Geometrijski prosjek	
		Mikroorganizmi (u 1 mL)	Somatske stanice (u 1 mL)
Mlijeko	I	≤ 100.000	≤ 400.000
	II	> 100.000	> 400.000
Ovčje i kozje mlijeko	I	≤ 1.500.000	
	II	> 1.500.000	

I i II - prva (I) i druga (II) klasa sirovog mlijeka zavisno od prosječnog broja mikroorganizama i broja somatskih stanica u mlijeku

Liječenje i kontrola mastitisa uključuju primjenu intramamarnih antibiotskih pripravaka tijekom laktacije ili za vrijeme suhostaja (BAČIĆ, 2009.; ERSKINE i sur., 2003.;

MCDOUGALL i sur., 2009.). Samoizlječenje kod supkliničkog mastitisa postiže se u 11% slučajeva (OLIVER i sur., 2004.) ili 21% slučajeva (SANDGREN i sur., 2008.).

Osim što mastitis smanjuje proizvodnju mlijeka, takvo mlijeko je lošije kvalitete, u organizmu na molekularnm nivou dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala što vodi organizam jedinke u oksidacijski stres (ATAKISI i sur., 2010.; BOUWSTRA i sur., 2010.). Oksidacijski stres je stanje narušene ravnoteže u prooksidativno-antioksidativnom sustavu u korist oksidacijskih procesa pri čemu dolazi do oštećenja tkiva (CELI, 2011.). Najpoznatiji slobodni radikali u biološkim sustavima su slobodni radikali kisika i njihovi metaboliti, obično nazvani ROS. ROS se neprekidno stvaraju kao normalni nusproizvodi staničnog metabolizma, te pri niskim koncentracijama, bitni su za odvijanje nekoliko fizioloških procesa: fosforilaciju proteina, staničnu diferencijaciju, apoptozu, sazrijevanje oocita, steroidogenezu i staničnu imunost (CELI, 2011.). Kada dođe do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala koje stanični homeostatski mehanizmi nisu u stanju neutralizirati, dolazi do oštećenja organa i tkiva (SAYEED i sur., 2003.; MORALES i sur., 2004.). Na molekularnom nivou slobodni radikali mogu modificirati proteine, oštetiti DNA i stanične transkripcijske elemente, te inicirati lančanu reakciju koja uzrokuje lipidnu peroksidaciju (KEHRER, 2000.).

Antioksidativne molekule u organizmu uklanjaju ROS ili oksidativno promijenjene molekule. Endogeni antioksidanti mogu se podijeliti u nekoliko skupina, uključujući enzimske antioksidante tj. superoksid dismutazu (SOD), glutation-peroksidazu (GSH-Px), katalazu, paraoksonazu i druge antioksidativne enzime te brojne neenzimske molekule s antioksidativnim djelovanjem: vitamin E, vitamin C, β-karoten, glutation, albumin, metalotionein, transferin, urati, bilirubin, ceruloplazmin (SABOČANEC, 2006.). Enzimi predstavljaju glavni oblik unutarstanične antioksidacijske obrane (CELI, 2011.). Aktivnost GSH-Px dokazana je u sirovom kravljem mlijeku i ljudskom mlijeku te njegova aktivnost značajno korelira s koncentracijom selena (HOJO, 1986.; DEBSKI i sur., 1987.). Utvrđeno je da se GSH-Px aktivnost i količina selena u ljudskom mlijeku smanjuju s vremenom laktacije i postižu plato mjesec dana nakon porođaja (HOJO, 1986.). Aktivnost citoplazmatske GSH-Px doprinosi oksidativnoj obrani životinjskih tkiva kataliziranjem redukcije vodikovog peroksida i lipidnih peroksida, te se također smatra indikatorom oksidacijskog stresa. Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala u H_2O_2 i smatra se prvom obranom protiv prooksidansa (CELI, 2011.).

Mjerenje antioksidacijske sposobnosti obrane od ROS moguće je analizom aktivnosti/koncentracije jedne komponente obrane ili pak antioksidacijskog potencijala nekog sustava. Prosječen biološki antioksidacijski potencijal u mlijeku ljudi iznosi 3807 ± 103.5 μmol/L (EZAKI i sur., 2008.).

Zbog svega navedenog, danas se sve više pridaje značaj razvoju intramamarnog pripravka koji će naći primjenu u profilaksi i terapiji mastitisa krava i koza. Kao takav koristio bi se kao alternativa i/ili nadopuna antimikrobnoj terapiji koja se rutinski primjenjuje (BRADLEY, 2002.).

Jedan od mogućih pripravaka je propolis. Iako sastav propolisa varira ovisno o geografskom podrijetlu, važno je istaknuti njegova antibakterijska, antimikotička i antivirusna svojstva. Propolis (pčelinje ljepilo) je generičko ime za smolastu tvar koju skupljaju pčele s određenih dijelova biljaka. Riječ «propolis» je izvedena od grčke riječi pro- (obrana) i polis (grad), što označava obranu grada (u ovom slučaju košnice). Pčele *(Apis mellifera, L.)* skupljaju smolu, žvaču ju i oplemenjuju enzimima izlučenih iz submandibularnih žlijezda slinovnica. Tako djelomice probavljen materijal miješaju s pčelinjim voskom i koriste u izgradnji košnice, te njime dezinficiraju košnicu i štite je od nepovoljnih vanjskih utjecaja (GHISALBERI, 1979.). Podaci u literaturi opisuju korištenje propolisa tijekom više od 2000 godina. Stari Egipćani su ga koristili za balzamiranje i mumificiranje, dok Grci i Rimljani opisuju njegovo korištenje u liječenju raznih kožnih oboljenja (CRANE, 1999.). Dokazano ima antiseptička, antitumorska, bakteriostatska, antiupalna, anestetska i antioksidacijska svojstva. Upravo zbog toga njegova uporaba je neograničena (BURDOCK, 1998.). Različita boja, miris i kemijski sastav propolisa, rezultat je skupljanja s raznih biljnih izvora. Propolis sadrži 50% balzama i smola, 30% pčelinjeg voska, 5% polena, 10% eteričnih ulja i 5% ostalih organskih komponenti. Posljednja dva uključuju fenole male molekulske mase za koje se smatra da imaju biološki aktivna svojstva, a to su flavonoidi, fenolne kiseline i esteri, aromatski aldehidi i terpenoidi (SHIMIZU i sur., 2004.). Sastav propolisa iznimno je kompleksan, varira ovisno o geografskom podrijetlu, te je zbog toga samo frakcioniranje i dobivanje zasebnih komponentni teško. Unatoč promjenjivom kemijskom sastavu, njegova antibakterijska, antimikotička i antivirusna svojstva su postojana (KUJUMGIEV i sur., 1999.). Zbog širokog spektra bioloških aktivnosti i upotrebe u zdravstvenoj hrani kao i u narodnoj medicini, obnovljen je interes za sastav propolisa i njegovu biološku aktivnost (BANSKOTA i sur., 2001.).

Glavna karakteristika flavonoida je visok antioksidacijski potencijal zbog uloge „hvatača“ slobodnih radikala (PASCUAL i sur., 1994.). Oni stabiliziraju reaktivne kisikove spojeve tako da reagiraju s aktivnom komponentom radikala, te time zbog visoke reaktivnosti hidroksilne skupine flavonoida, radikali postaju neaktivni (NIJVELDT i sur., 2001.).

Dokazan je antimikrobni učinak propolisa na izdvojene uzročnike mastitisa u krava (FIORDALISI i sur., 2016.). Trenutna istraživanja usmjerena su na procjenu učinkovitosti etanolnih ekstrakata propolisa (EEP) na *S. aureus* (SANTANA i sur., 2012.). Etanolni ekstrakti bili su baktericidni prema *S. aureus* u fosfatnom puferu, dok je za baktericidni učinak u mlijeku potrebna višestruko veća doza propolisa.

Upotrebu propolisa kao samostalne aktivne supstance ili u kombinaciji s drugim antimikrobnim sredstvima treba ispitati *in vivo.* Stoga je cilj ovog diplomskog rada istražiti utjecaj bezalkoholne otopine propolisa primijenjene intramamarno u liječenju supkliničkih mastitisa na antioksidacijska svojstva mlijeka krava i koza. Usporedit će se učinak trokratne aplikacije propolisa na aktivnost superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, biološki antioksidacijski potencijal i koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita. Utvrdit će se postoje li vrsne specifičnosti oksidacijske stabilnosti mlijeka nakon intramamarne aplikacije propolisa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ŽIVOTINJE

Istraživanje je provedeno na SNK farmi mliječnih krava pasmine Holstein i farmi alpina koza u vlasništvu OPG Matijašec iz Sigeteca Ludbreškog.

U istraživanje je uključeno 20 mliječnih krava i 25 koza kod kojih je dijagnosticiran supklinički mastitis u barem jednoj četvrti vimena krava, odnosno u lijevoj i desnoj polovici vimena koza. Krave su tijekom istraživanja boravile u štalama, a držane su slobodno na stelji. Na farmi je bilo 130 krava u laktaciji s prosječnom proizvodnjom 6300 kg mlijeka po kravi u jednoj laktaciji koja traje oko 305 dana. Sastav i količina hrane prikazani su u Tablici 4-6.

Koze su tijekom istraživanja boravile u štalama, a držane su slobodno na dubokoj stelji. Na farmi je bilo 170 koza u laktaciji s prosječnom proizvodnjom 500-600 kg mlijeka po kozi u jednoj laktaciji koja traje oko 300 dana. Hranjene su u vrijeme pokusa sijenom po volji, minimalno 2 kg po kozi i koncentratom koji sadrži 16% sirove bjelančevine, oko 1 kg po kozi dnevno podijeljeno u dva obroka (jutarnja i večernja mužnja). Sastav smjese koncentrata sa 16% proteina prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav koncentrata za koze sa 16% proteina (prema deklaraciji proizvođača)

Izvor: http://www.belje.hr/tvornica-stocne-hrane-belje/proizvodi-za-ostale-zivotinje/

HRANIDBENI SASTAV KRMNE SMJESE	
Kukuruz	Ječam
Suncokret pogača	Pšenično krmno brašno
Sojina sačma	Termički obrađena soja
Vapnenac	Morska sol
Monokalcij fosfat	Biljno ulje
Biljno ulje	Premiks
Magnezij oksid	Aroma
ANALITIČKI SASTAV SMJESE	KOLIČINA
Sirove bjelančevine (%)	16,10
Sirova vlakna (%)	5,94
Sirove masti (%)	4,16
Sirovi pepeo (%)	6,12
Kalcij (%)	0,98
Fosfor (%)	0,50
Natrij (%)	0,40

U smjesu je dodano i 2% vitaminsko-mineralnog dodatka Ovisan®. Sastav vitaminsko-mineralnog dodatka Ovisan® naveden je u Tablici 3. Voda je životinjama bila dostupna *ad libitum.*

Tablica 3. Sastav vitaminsko-mineralnog dodatka Ovisan®
Izvor: http://www.sano.hr/hr/product/ovisan

SIROVINSKI SASTAV SMJESE	
Kalcijev karbonat	Monokalcijev magnezijev fosfat
Natrijev klorid	Pšenično brašno s posijama
Melasa šećerne repe	Predsmjesa vitamina i djelatnih tvari
Magnezijev oksid	Predsmjesa elemenata u tragovima
KEMIJSKI SASTAV SMJESE	KOLIČINA
Kalcij (%)	19,0
Fosfor (%)	4,0
Natrij (%)	9,0
Magnezij (%)	3,0
SADRŽI PO KILOGRAMU	KOLIČINA
Vitamin A (i. j.)	300000
Vitamin D_3 (i. j.)	80000
Vitamin E (mg)	1000
Željezo (mg)	2000
Cink (mg)	6000
Mangan (mg)	4000
Jod (mg)	100
Kobalt (mg)	20
Selen (mg)	30

Krave su držane slobodno na dubokoj stelji, i hranjene standardnom smjesom za muzne krave. Standardna smjesa za muzne krave tjelesne težine do 650 kg razlikovala se u pojedinim sastojcima sirovine, ovisno o količini proizvedenog mlijeka po kravi. Sastav standardne smjese za muzne krave za proizvodnju 20 ili 40 litara mlijeka prikazan je u Tablici 4., a količina utrošenih sirovina prikazana je u Tablici 5. i Tablici 6.

Tablica 4. Sirovine za standardnu smjesu za muzne krave proizvodnje 20 litara mlijeka
Izvor: BOSGEN d.o.o.

SIROVINE	20 LITARA MLIJEKA		
	Suha tvar (g)	Ukupno S.T. (g)	Udio (kg)
Smjesa 22%	883	5296	6,000
Kukuruz silirani 30 S.T., zrnasta	300	7200	24,000
Livadno sijeno, 2. otkos, cvatnja	860	3440	4,000
Pšenična slama	860	430	0,500
Ukupno		16366	34,500

Tablica 5. Sirovine za standardnu smjesu za muzne krave proizvodnje 40 litara mlijeka
Izvor: BOSGEN d.o.o.

SIROVINE	40 LITARA MLIJEKA		
	Suha tvar (g)	Ukupno S.T. (g)	Udio (kg)
Smjesa 20%	883	10592	12,000
Kukuruz silirani 30 S. T., zrnasta	300	6000	20,000
Sjenaža ljulja 32% S. T.	320	2560	8,000
Livadno sijeno, 2. otkos, mlado	860	3440	4,000
Soja, normalni tip 46	870	870	1,000
Ukupno		23462	45,000

Tablica 6. Sastav standardne smjese muznih krava po kg proizvedenog mlijeka

Izvor: BOSGEN d.o.o.

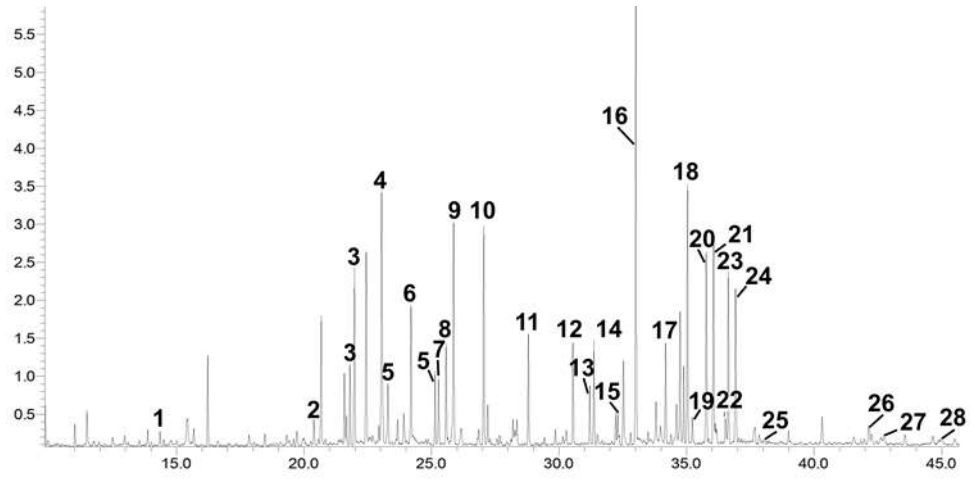
SASTOJAK SIROVINE	KOLIČINA	
	20 LITARA MLIJEKA	**40 LITARA MLIJEKA**
Suha tvar (g)	16366	23462
NEL-preživači (MJ)	107,81	164,05
Sirovi protein (g)	2347,20	4660,40
Sirova mast (g)	480,77	709,93
Škrob (g)	3913,56	5817,11
Šećer (g)	462,61	1050,42
% neprobavljeni protein	25,54	24,27
% nerazrađeni škrob	24,80	23,05
% s. vlaknina/kg S. T.	19,03	13,97
Kalcij (g)	162,134	286,848
Fosfor (g)	69,571	123,812
Natrij (g)	38,518	73,496
Magnezij (g)	97,418	179,136
Ca:P	= 2,33:1	= 2,32:1
Sirova vlaknina (g)	3113,66	3278,31
NEL / kg S. T. (kg)	6,59	6,99
Žitarice (g)	3780,00	7560,00
Vitamin A (IJ)	63600	127200
Vitamin D (IJ)	40200	80400
Vitamin E (mg)	384	768
Volumen (g)	34490,02	44980,03
Cink (mg)	633,60	1267,20
Željezo (mg)	132,00	264,00
Mangan (mg)	396,00	792,00
Bakar (mg)	79,20	158,40
Kobalt (mg)	2,88	5,76
Jod (mg)	4,32	8,64
Selen (mg)	3,96	7,92
Bilanca elektrolita (meq/kg)	127	99

Supklinički mastitis krava dijagnosticiran je prije i nakon svake aplikacije propolisa mjerenjem broja somatskih stanica (SCC) u mlijeku na uređaju DeLaval (Tetra Laval, Švedska) optičkim automatskim brojanjem somatskih stanica i mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka prije aplikacije u akreditiranom laboratoriju Hrvatskog veterinarskog instituta prema preporukama opisanima u *Laboratory handbook on bovine mastitis* (National mastitis council, 1999.). Broj somatskih stanica iznad 200000 m/L je određen kao pokazatelj supkliničkog mastitisa (RUEGG i PANTOJA, 2013.). Mikrobiološkom pretragom su u pozitivnim uzorcima mlijeka dokazani uzročnici: *Staphylococcus spp. (CNS), Streptococcus spp., Streptococcus uberis, Pseudomonas, Corynebacterium spp., E. coli, Serratia spp., Klebsiella spp.* i dr.

Supklinički mastitis koza dijagnosticiran je prije aplikacije propolisa mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka u akreditiranom laboratoriju Hrvatskog veterinarskog instituta prema preporukama opisanima u *Laboratory handbook on bovine mastitis* (National mastitis council,1999.). Kontrolna mikrobiološka pretraga napravljena je 7 dana nakon prve aplikacije propolisa. Mikrobiološkom pretragom su u pozitivnim uzorcima mlijeka dokazani uzročnici: *Staphylococcus spp. (CNS), Streptococcus spp., Streptococcus uberis, Staphylococcus aureus, Trueperella pyogenes i Enterococcus spp* .

3.2. ANALIZA PRIPRAVKA NATIVNOG PROPOLISA

Analiza sastava ekstrakta hrvatskog nativnog propolisa (Hedera d.o.o., Split) provedena je metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom na Shimadzu GC-MS Ultra Gas ChromatographMass Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan), a analiza formulacije metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-Vis detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan) u Zavodu za prehranu i dijetetiku domaćih životinja, Veterinarskog fakulteta kako bi se ustanovila zastupljenost polifenola i ostalih biomarkera u nativnom propolisu iz hrvatskih pčelinjaka s područja Dalmacije, korištenom u ovom istraživanju. Rezultati analize sastava ekstrakta hrvatskog nativnog propolisa provedeni na GC-MS-u prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Reprezentativni kromatogram spojeva utvrđenih u ekstraktu propolisa na Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). 1. trans-cinamična kiselina, 2. 4-metoksicinamična kiselina, 3. D-fruktoza, 4. p-kumarinska kiselina, 5. D-glukoza, 6. 3,4-dimetoksicinamična kiselina, 7. palmitinska kiselina, 8. trans-izoferulna kiselina, 9. ferulna kiselina, 10. kafeinska kiselina 11. stearinska kiselina, 12. 3-metil-3-butenil kafeat, 13. 2-metil-2-butenil kafeat, 14. 3-metil-2-butenil kafeat, 15. pinostrobin, 16. pinocembrin, 17. pinobanksin, 18. pinobanksin-3-acetat, 19. tektokrisin, 20. benzil kafeat, 21. krisin, 22. saharoza, 23. galangin, 24. feniletil kafeat, 25. naringenin, 26. kaempferol, 27. apigenin, 28. kvercetin.

3.2.1. PROTOKOL

Nakon što je kod krava ustanovljen supklinički mastitis u barem jednoj od četiri četvrti vimena, pripravak propolisa apliciran je trokratno u pozitivne četvrti vimena: nakon jutarnje mužnje, nakon večernje mužnje te sljedeći dan nakon jutarnje mužnje. U istraživanju su korištene otopine 1% propolisa u polietilenglikolu, pripremljene inovativnim zaštićenim postupkom u pogonu tvrtke Hedera d.o.o.

Koze čije je mlijeko bilo pozitivno na mikrobiološkom pregledu podijeljene su u dvije skupine: jednoj skupini (N=16) aplicirana je otopina 5% nativnog propolisa u polietilenglikolu, pripremljena inovativnim zaštićenim postupkom u pogonu tvrtke Hedera d.o.o., dok je drugoj skupini aplicirana intramamarna suspenzija klavuxila (N=9) trokratno kao i kravama.

3.3. UZORKOVANJE

Uzorke mlijeka krava iz svake pojedinačne četvrti uzimali smo u prethodno označene sterilne plastične epruvete tako da su nakon izmuzivanja prvih nekoliko mlazova mlijeka vrhovi sisa temeljito dezinficirani vatom namočenom 70%-tnim etilnim alkoholom. Uzorke mlijeka koza iz lijeve i desne polovice vimena uzimali smo u prethodno označene sterilne plastične epruvete nakon izmuzivanja prvih nekoliko mlazova mlijeka.

Uzorci mlijeka krava su uzeti prije prve aplikacije propolisa, 12 h nakon prve aplikacije, 24 h nakon prve aplikacije propolisa te 7. dan nakon prve aplikacije propolisa. Uzorci mlijeka koza uzeti su u istim vremenskim intervalima kao i uzorci mlijeka krava.

Uzorci mlijeka držani su na 4 °C do sljedećeg dana kada su analizirani u Laboratoriju za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka pri Hrvatskom veterinarskom institutu. Uzorci mlijeka za biokemijske pretrage zamrznuti su do analiza na -20 °C.

3.3.1. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZE

Uzorci mlijeka su nakon pohranjivanja odmrznuti. Ukoliko se radilo o zdravim životinjama, uzorci mlijeka su pripremani i analizirani skupno *(poolirani*), a svi uzorci koji su bili mikrobiološki pozitivni analizirani su kao zaseban uzorak. Kako bi u mlijeku bilo moguće odrediti koncentracije d-ROM, BAP, SOD, GSH-Px uzorci mlijeka pripremljeni su modificiranom metodom temeljenom na radovima BERMEJO i sur. (1997.) i EZAKI i sur. (2008.), centrifugiranjem u dvije faze. U prvoj fazi mlijeko je centrifugirano 15 minuta na 1600 g, a nakon odvajanja staničnih elemenata supernatant je centrifugiran 45 minuta na 10000 g na temperaturi 4 °C. Za daljnju obradu korištena je frakcija uzorka iz kojeg su pipetiranjem odvojene masnoće u najvećoj mogućoj mjeri. Taj uzorak potom je korišten za mjerenje parametara oksidacijskog stresa.

3.4. BIOKEMIJSKE PRETRAGE

3.4.1. AKTIVNOSTI ENZIMA GLUTATION PEROKSIDAZE (GSH-PX)

Aktivnost enzima glutation peroksidaze u mlijeku određena je gotovim kompletom RANSEL tvrtke Randox (Irska) na automatskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan). GSH-Px katalizira oksidaciju glutationa (GSH) s kumena hidroperoksidom. Uz prisustvo glutation reduktaze i NADPH oksidirani oblik glutationa (GSSG) se odmah prevodi u reducirani oblik uz oksidaciju NADPH. Smanjenje absorbancije mjeri se pri 340 nm. Aktivnost GSH-Px izražena je u jedinicama po litri mlijeka.

3.4.2. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

Aktivnost superoksid dismutaze u mlijeku određena je gotovim kompletom RANSOD tvrtke Randox (Irska) na automatskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan). Metoda se osniva na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina pomoću ksantin oksidaze koji reagiraju s 2-(4-jodofenil)3-(4-nitrofenil)5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost SOD se mjeri kao stupanj inhibicije ove reakcije. Aktivnost SOD izražena je u jedinicama po litri mlijeka.

3.4.3. KONCENTRACIJA REAKTIVNIH KISIKOVIH METABOLITA

Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita u mlijeku određena je d-ROM (*engl. reactive oxygen metabolites*) gotovim kompletom (Diacron International, Italija) na automatskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan).

U d-ROM testu, reaktivni kisikovi metaboliti (primarno hidroperoksidi ROOH) u biološkom uzorku koji se analizira, u prisustvu željeza (oslobođenog iz proteina plazme pomoću kiselog pufera, R2 reagensa u kitu), generiraju alkoksilne (Ro*) i peroksilne (R-OO*) radikale Fentonovom reakcijom. Radikali reagiraju sa supstituiranim aromatskim aminom (A-NH_2 u mješavini kromogena, R1 reagens u kitu), oksidiraju amine te dolazi do promjene

boje u ružičastu ($[A\text{-}NH_2*]^+$). Produkt reakcije mjeri se fotometrijski, te je intenzitet boje razmjeran koncentraciji reaktivnih kisikovih metabolita, prema Lambert- Beerovu zakonu.

3.4.4. BIOLOŠKI ANTIOKSIDACIJKSI POTENCIJAL (*engl. biological antioxidant potential,* BAP)

Biološki antioksidacijski potencijal predstavlja ukupnu mjeru više antioksidansa. Koncentracija antioksidansa u mlijeku izmjerena je na automatskom analizatoru Olympus AU640 (Olympus, Japan) korištenjem gotovog kompleta (Diacron International, Italija).

U BAP testu uzorak plazme koji se testira dodaje se u obojenu otopinu koja sadrži feri ion ($FeCl_3$, željezov klorid i R2 reagens) s posebnim homogenim supstratom (tiocijanat, R1 reagens). Nakon kratke inkubacije (5 min) otopina će se odbojati, a intenzitet tih promjena biti će razmjeran sposobnosti plazme da reducira feri ione. Fotometrijskom procjenom intenziteta odbojenosti količina reduciranih feri iona može se precizno izračunati, a redukcijska sposobnost ili antioksidacijski stupanj krvne plazme može se precizno izmjeriti.

3.5. BROJ SOMATSKIH STANICA

Broj somatskih stanica u mlijeku krava određivan je prije aplikacije 1% propolisa, 12 sati nakon prve aplikacije propolisa, 12 sati nakon druge aplikacije propolisa, 12 sati nakon treće aplikacije propolisa, 5 i 7 dana nakon treće aplikacije propolisa na brojaču somatskih stanica DeLaval (DeLaval Group, Švedska) koji mjeri broj somatskih stanica u rasponu od 10000 do 5 000 000 somatskih stanica/mL mlijeka.

3.6. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička jedinica korištena u istraživanju bila je četvrt vimena krava, te lijeva i desna polovica vimena koza. U statističkoj obradi posebno su grupirane četvrti ili polovice vimena čiji su rezultati mikrobiološke pretrage bili negativni na poznate uzročnike mastitisa (negativne četvrti/polovice), a posebno grupirane one u kojima su mikrobiološkim analizama

pronađeni neki od uzročnika mastitisa (pozitivne četvrti/polovice). Rezultati su obrađeni statistički korištenjem računalnog programa Statistica 12 i prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SV ± SD). Normalnost distribucije provjerena je Shapiro-Wilks testom. Uspoređivani su rezultati nakon tretmana propolisom s rezultatima prije tretmana analizom ponovljenih mjerenja (Kruskal-Wallisovom analizom varijance i testom sume rangova). Testirane su razlike između mikrobiološki pozitivnih i negativnih uzoraka tijekom istraživanja i statističke razlike u aplikaciji propolisa i antibiotika kod koza (Mann-Whitney U test). Razlike se smatraju statistički značajnima ako je $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

AKTIVNOSTI I KONCENTRACIJE ANTIOKSIDANSA I REAKTIVNIH KISIKOVIH METABOLITA U MLIJEKU KOZA

Tablica 7. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (U/L)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + antibiotik	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	316 ± 101^{a1}	268 ± 10^{a1}	374 ± 124^{a2}
12 sati nakon prve aplikacije	372 ± 164^{a1}	298 ± 72^{a1}	581 ± 193^{b2}
24 sata nakon prve aplikacije	315 ± 110^{a1}	344 ± 167^{a1}	508 ± 112^{ab2}
7 dana nakon prve aplikacije	324 ± 112^{a1}	312 ± 85^{a1}	374 ± 214^{a1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Najveće aktivnosti GSH-Px utvrđene su 12 sati nakon prve aplikacije 5% intramamarne suspenzije propolisa te su bile značajno veće od vrijednosti prije aplikacije kao i 7 dana nakon prve aplikacije ($p<0,05$). U grupi mikrobiološki negativnih uzoraka kao i u grupi tretiranoj antibiotskom suspenzijom nisu utvrđene statistički značajne razlike tijekom uzorkovanja ($p>0,05$).

Najveće aktivnosti GSH-Px 12 sati nakon prve aplikacije, te isto tako 24 sata nakon prve aplikacije utvrđene su u mlijeku skupine koza koje su tretirane propolisom te je značajno veća od aktivnosti negativne grupe te grupe tretirane antibiotikom ($p<0,05$). U mjerenju

aktivnosti GSH-Px 7 dana nakon prve aplikacije nisu utvrđene statistički značajne razlike između negativnih uzoraka u mlijeku koza i uzoraka koza koje su tretirane propolisom ili antibiotikom ($p>0,05$).

Tablica 8. Biološki antioksidacijski potencijal (BAP) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (mmol/L)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + antibiotik	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	$6,01 \pm 0,77^{a1}$	$6,11 \pm 0,27^{a1}$	$5,69 \pm 0,86^{ab1}$
12 sati nakon prve aplikacije	$5,82 \pm 0,93^{a1}$	$6,21 \pm 0,48^{a1}$	$4,96 \pm 0,97^{a2}$
24 sata nakon prve aplikacije	$6,15 \pm 0,43^{a1}$	$6,08 \pm 0,42^{a1}$	$5,37 \pm 0,68^{ab2}$
7 dana nakon prve aplikacije	$6,18 \pm 0,57^{a1}$	$6,13 \pm 0,29^{a1}$	$6,26 \pm 0,24^{b1}$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Koncentracija BAP porasla je 7 dana nakon prve aplikacije 5% intramamarne suspenzije propolisa u usporedbi s vrijednostima utvrđenim 12 sati nakon prve aplikacije ($p<0,05$). U grupi mikrobiološki negativnih uzoraka kao i u grupi tretiranoj antibiotskom suspenzijom nisu utvrđene statistički značajne razlike tijekom uzorkovanja ($p>0,05$). U koncentraciji BAP prije aplikacije i 7 dana nakon prve aplikacije nisu utvrđene statistički značajne razlike između negativnih uzoraka u mlijeku koza i uzoraka koza su tretirane propolisom ili antibiotikom ($p>0,05$).

Koncentracije BAP u mlijeku 12 sati i 24 sata nakon prve aplikacije u skupine koza koje su tretirane propolisom bila je značajno manja od koncentracije negativne grupe te grupe tretirane antibiotikom ($p<0,05$).

Tablica 9. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (U/ml)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + antibiotik	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	$4,51 \pm 1,44^{a1}$	$4,53 \pm 2,00^{a1}$	$3,92 \pm 1,37^{a1}$
12 sati nakon prve aplikacije	$4,48 \pm 1,52^{a1}$	$5,13 \pm 2,14^{a1}$	$4,08 \pm 2,06^{a1}$
24 sata nakon prve aplikacije	$4,04 \pm 1,73^{a1}$	$4,79 \pm 2,22^{a1}$	$2,67 \pm 1,30^{a1}$
7 dana nakon prve aplikacije	$4,79 \pm 1,38^{a1}$	$4,93 \pm 1,68^{a1}$	$3,48 \pm 1,43^{a1}$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Tijekom istraživanja nisu utvrđene značajne promjene u aktivnosti SOD kao ni razlike između skupina ($p>0,05$).

Tablica 10. Omjer glutation peroksidaze i superoksid dismutaze (GSH-Px/SOD) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + antibiotik	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	$0,08 \pm 0,04^{a1}$	$0,07 \pm 0,03^{a1}$	$0,11 \pm 0,04^{a1}$
12 sati nakon prve aplikacije	$0,09 \pm 0,06^{a1}$	$0,09 \pm 0,10^{a1}$	$0,20 \pm 0,11^{ab2}$
24 sata nakon prve aplikacije	$0,09 \pm 0,06^{a1}$	$0,08 \pm 0,09^{a1}$	$0,24 \pm 0,16^{b2}$
7 dana nakon prve aplikacije	$0,08 \pm 0,05^{a1}$	$0,08 \pm 0,05^{a1}$	$0,14 \pm 0,12^{a1}$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Omjer GSH-Px/SOD nakon aplikacije 5% intramamarne suspenzije propolisa raste 12 sati nakon prve aplikacije, te isto tako 24 sata nakon prve aplikacije te se značajno razlikuje između mikrobiološki negativne grupe i grupa koje su tretirane antibiotikom ($p<0,05$).

Najveće aktivnosti GSH-Px utvrđene su u grupi mikrobioloških negativnih uzoraka 24 sata nakon prve aplikacije te su bile značajno veće od vrijednosti prije aplikacije ($p<0,05$).

AKTIVNOSTI I KONCENTRACIJE ANTIOKSIDANSA I REAKTIVNIH KISIKOVIH METABOLITA U MLIJEKU KRAVA

Tablica 11. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U/L)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	272 ± 16^{a1}	326 ± 110^{a1}
12 sati nakon prve aplikacije	319 ± 71^{ab1}	317 ± 89^{a1}
24 sata nakon prve aplikacije	356 ± 69^{b1}	367 ± 121^{a1}
7 dana nakon prve aplikacije	303 ± 84^{ab1}	284 ± 24^{a1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, [a, b]- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Najveće aktivnosti GSH-Px utvrđene su u grupi mikrobioloških negativnih uzoraka 24 sata nakon prve aplikacije te su bile značajno veće od vrijednosti prije aplikacije ($p<0,05$).

U grupi krava tretiranih 1% intramamarnom suspenzijom propolisa nisu utvrđene statistički značajne razlike tijekom uzorkovanja ($p>0,05$). Također, nisu utvrđene značajne razlike između mikrobiološki negativnih uzoraka i uzoraka tretiranih propolisom ($p>0,5$).

Tablica 12. Biološki antioksidacijski potencijal (BAP) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (mmol/L)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	6,21 ± 0,38 ^{a1}	6,25 ± 0,43 ^{a1}
12 sati nakon prve aplikacije	6,27 ± 0,24 ^{a1}	5,69 ± 1,24 ^{a1}
24 sata nakon prve aplikacije	6,26 ± 0,30 ^{a2}	5,13 ± 1,33 ^{a1}
7 dana nakon prve aplikacije	6,52 ± 0,40 ^{a2}	6,15 ± 0,31 ^{a1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

U mlijeku obje skupine krava nisu utvrđene statistički značajne razlike tijekom uzorkovanja ($p>0,05$).

U koncentraciji BAP 24 sata i 7 dana nakon prve aplikacije utvrđene su statistički značajno manje koncentracije u mlijeku skupine krava tretirane propolisom u odnosu na mikrobiološki negativnu skupinu ($p<0,05$).

Tablica 13. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (ROM) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U CARR)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	573 ± 275 ^{a1}	599 ± 227 ^{a1}
12 sati nakon prve aplikacije	728 ± 209 ^{a2}	540 ± 153 ^{a1}
24 sata nakon prve aplikacije	779 ± 58 ^{a2}	605 ± 30 ^{a1}
7 dana nakon prve aplikacije	526 ± 30 ^{a1}	533 ± 138 ^{a1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Koncentracija ROM u mlijeku obje skupine uzoraka mlijeka krava nije pokazivala značajne promjene tijekom uzorkovanja ($p>0,05$).

U koncentraciji ROM 12 i 24 sata nakon prve aplikacije utvrđene su statistički značajno manje koncentracije u skupini uzoraka mlijeka krava tretiranih propolisom u odnosu na negativne uzorke ($p<0,05$).

Tablica 14. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U/mL)

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	1,94 ± 0,75 ^{a1}	1,89 ± 0,77 ^{a1}
12 sati nakon prve aplikacije	2,03 ± 0,84 ^{a1}	1,53 ± 0,48 ^{a1}
24 sata nakon prve aplikacije	2,02 ± 0,60 ^{a1}	1,72 ± 1,44 ^{a1}
7 dana nakon prve aplikacije	1,94 ± 0,67 ^{a1}	1,84 ± 0,85 ^{a1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a, b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Tijekom istraživanja nisu utvrđene značajne promjene u aktivnosti SOD kako u ponovljenim mjerenjima tako i između skupina mlijeka krava ($p>0,05$).

Tablica 15. Omjer glutation peroksidaze i superoksid dismutaze (GSH-Px/SOD) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa

	Negativni uzorci	Pozitivni uzorci + propolis
Prije aplikacije	$0,16 \pm 0,05^{a\,1}$	$0,19 \pm 0,06^{a1}$
12 sati nakon prve aplikacije	$0,17 \pm 0,06^{a1}$	$0,23 \pm 0,12^{a1}$
12 sati nakon prve aplikacije	$0,19 \pm 0,05^{a1}$	$0,45 \pm 0,52^{a1}$
7 dana nakon prve aplikacije	$0,17 \pm 0,08^{a1}$	$0,18 \pm 0,07^{a1}$

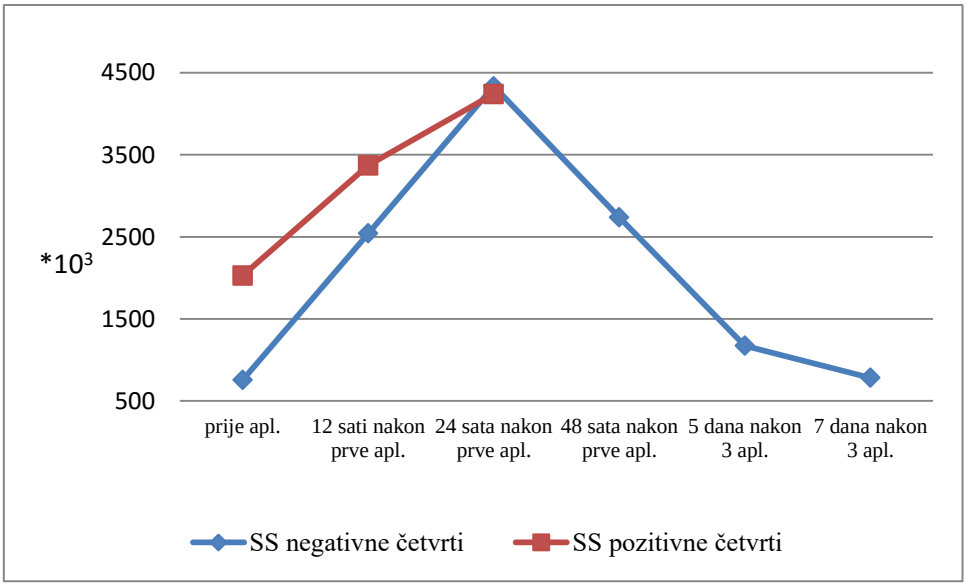
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, $^{a,\ b}$- različiti superskripti označavaju značajne razlike između uzorkovanja ($p<0,05$); 1,2- različiti superskripti označavaju značajne razlike između negativnih uzoraka i uzoraka mlijeka tretiranih životinja

Tijekom istraživanja nisu utvrđene značajne promjene u omjeru enzima GSH-Px/SOD kako u ponovljenim mjerenjima tako i između uzoraka skupina mlijeka krava ($p>0,05$).

4.1. UTJECAJ APLIKACIJE PROPOLISA NA BROJ SOMATSKIH STANICA (BSS) U UZORCIMA MLIJEKA KRAVA

Broj somatskih stanica u mlijeku krava određen je prije aplikacije 1% propolisa, 12 sati nakon prve aplikacije propolisa, 24 sata nakon prve aplikacije propolisa, 48 sati nakon prve aplikacije propolisa, te 5. i 7. dana nakon treće aplikacije propolisa (Slika 2). Istovremeno su uzeti uzorci mlijeka za mikrobiološku pretragu. Prema nalazima akreditiranog laboratorija od ukupno 38 uzoraka prije aplikacije propolisa bakteriološki negativno je bilo 29 uzoraka s prosječnim BSS 757000/mL mlijeka. Mikrobiološki pozitivnih je bilo 9 uzoraka s prosječnim BSS 2029000/mL mlijeka. Drugo uzorkovanje koje je načinjeno 12 sati nakon prve aplikacije pokazuje 32 mikrobiološki negativna uzorka s prosječnim BSS 2543000/mL mlijeka. Mikrobiološki pozitivnih je bilo 6 uzoraka s prosječnim BSS 3372000/mL mlijeka. Broj mikrobiološki negativnih uzoraka 24 sata nakon prve aplikacije iznosio je 34 uzorka s prosječnim BSS 4336000/mL mlijeka. Mikrobiološki pozitivno je bilo 4 uzoraka s prosječnim BSS 4241000/mL mlijeka. Svi pretraženi uzorci mlijeka kod treće aplikacije, odnosno 48 sati nakon prve aplikacije, bili su mikrobiološki negativni te su imali prosječan BSS 2738000/mL mlijeka. Od ukupno uzorkovana 34 uzorka mlijeka 5 dana nakon treće aplikacije propolisa, svi pretraženi uzorci bili su negativni, a prosječan BSS iznosio je 1174000/mL mlijeka. Sedam dana nakon treće aplikacije propolisa uzorci mlijeka bila su mikrobiološki negativni s BSS 783000/mL mlijeka.

Na temelju svega navedenog možemo zaključiti da je porast broja somatskih stanica zabilježen u mikrobiološki negativnim, ali isto tako i mikrobiološki pozitivnim uzorcima mlijeka. Takvi rezultati ukazuju da intramamarna formulacija bezalkoholne otopine propolisa uzrokuje upalne promjene u vimenu krava. Budući da se 7 dana nakon treće aplikacije propolisa BSS vratio na početne vrijednosti, te nema više pozitivnih, zaključujemo da je dražeći učinak propolisa nestao, a da je propolis imao antibakterijsko djelovanje. Kod krava utvrđena je 100% uspješnost antibakterijskog djelovanja 1% propolisa.



Slika 2. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 1%-tne bezalkoholne otopine propolisa

4.2. UČINKOVITOST APLIKACIJE PROPOLISA I ANTIBIOTIKA U LIJEČENJU SUPKLINIČKOG MASTITISA KOZA

Supklinički mastitis koza dijagnosticiran je prije aplikacije propolisa početnom mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka u akreditiranom laboratoriju Hrvatskog veterinarskog instituta. Kontrolna mikrobiološka pretraga napravljena je 7 dana nakon prve aplikacije propolisa. Mikrobiološkom pretragom su u pozitivnim uzorcima mlijeka dokazani uzročnici: *Staphylococcus spp. (CNS), Streptococcus spp., Streptococcus uberis., Staphylococcus aureus, Trueperella pyogenes i Enterococcus spp* .

U istraživanje učinka 5% intramamarne suspenzije propolisa bilo je uključeno ukupno 16 koza od kojih je uzorkovano 32 uzorka mlijeka. Pri tome je bilo 11 mikrobiološki pozitivnih uzoraka i 21 mikrobiološki negativnih uzoraka. U pozitivne polovice vimena apliciran je propolis trokratno svakih 12 sati. Nakon 7 dana od prve aplikacije 5% propolisa, samo 3 uzorka su bila pozitivna. Na osnovi rezultata kontrolne mikrobiološke pretrage utvrđen je antibakterijski učinak propolisa u 73% uzoraka mlijeka koza.

U drugoj skupini u kojoj je bilo 9 koza, tretirali smo pozitivne polovice vimena intramamarnim pripravkom antibiotika klavuxila. Od ukupno 18 uzoraka mlijeka iz svake polovice vimena 11 je bilo mikrobiološki pozitivno, a 7 mikrobiološki negativno. U pozitivne polovice vimena apliciran je antibiotik trokratno s razmakom od 12 sati. Nakon 7 dana od

aplikacije antibiotika sve polovice vimena, odnosno uzorci mlijeka iz svih polovica vimena dali su mikrobiološki negativne rezultate. Na temelju navedenog, utvrđena je 100% učinkovitost antibiotika u liječenju supkliničkog mastitisa.

5. RAZMATRANJE

Utvrđen je utjecaj intramamarnog pripravka 1% propolisa na oksidacijski stres organizma krava, odnosno razlike primjene intramamarnih pripravaka 5% propolisa i suspenzije klavuxila u koza. U uzorcima mlijeka koza aplikacija propolisa dovela je do porasta aktivnosti GSH-Px nakon prve aplikacije, BAP 7 dana od prve aplikacije propolisa i omjera GSH-Px/SOD nakon druge aplikacije propolisa. U mlijeku skupine koza tretirane propolisom utvrđena je veća aktivnost GSH-Px nakon druge aplikacije, i omjera GSH-Px/SOD nakon prve i druge aplikacije u odnosu na skupinu tretiranu antibiotikom. U mikrobiološki pozitivnim uzorcima mlijeka krava aplikacija 1% propolisa dovela je do smanjenja koncentracije BAP 24 sata nakon prve aplikacije i ROM 12 i 24 sata nakon prve aplikacije u odnosu na negativne uzorke.

Tijekom razvoja mastitisa, mlijeko iz supklinički inficirane mliječne žlijezde podliježe oksidativnom stresu, što rezultira značajnim smanjenjen antioksidativne sposobnosti mlijeka (SILANIKOVE i sur., 2014.). Kod praćenja razine oksidacijskog stresa u mliječnih životinja važno je pratiti koncentracije prooksidativnih i antioksidativnih spojeva. Informacije o razini oksidacijskog stresa preciznije su kada se kombiniraju npr. ROM i BAP podaci, nego kad ih se koriste odvojeno (CELI, 2011.).

Aktivnost GSH-Px dokazana je u sirovom kravljem mlijeku i ljudskom mlijeku te njegova aktivnost značajno korelira s koncentracijom selena (HOJO, 1986.; DEBSKI i sur., 1987.). U našem istraživanju u mikrobiološki negativnim uzorcima mlijeka utvrdili smo aktivnost GSH-Px u krava i koza. Pri tome su aktivnosti GSH-Px u mlijeku koza bile za oko 16% veće. Na aktivnosti GSH-Px i SOD utječu hranidba, sezona (CELI, 2011.) i faza proizvodnje. Naime, kod koza u laktaciji aktivnost SOD se smanjuje za vrijeme postpartalnog razdoblja, što je posljedica manje proizvodnje ROM (CELI, 2011.). Jednako tako aktivnost GSH-Px i koncentracija selena u ljudskom mlijeku smanjuju se tijekom laktacije, a najviše vrijednosti postiže mjesec dana nakon porođaja (HOJO, 1986.).

U ovom istraživanju u mikrobiološki pozitivnim uzorcima mlijeka krava i koza prije tretmana propolisom utvrdili smo veće aktivnosti GSH-Px i veći broj somatskih stanica. ELSAMI i sur. (2015.) utvrdili su kod štakora smanjene aktivnosti GSH-Px-a u serumu, mlijeku te tkivu zahvaćenom mastitisom, u usporedbi sa zdravom skupinom, a ATROSHI i sur. (1996.) u krava s mastitisom i KIZIL i sur. (2007.) u koza s mastitisom uzrokovanim

M. agalalactiae utvrdili su smanjenje GSH-Px aktivnosti u krvi. HAMED i sur. (2008.) utvrdili su pozitivnu korelaciju BSS i aktivnosti GSH-Px u mlijeku krava. Porast GSH-Px u ovom istraživanju može se smatrati odgovorom na povećanje broja upalnih stanica u pozitivnoj četvrti/polovici vimena (mliječnoj jedinici).

Enzim SOD katalizira dismutaciju superoksidnog iona u vodikov peroksid (MANSSON i AKESSON, 2000.). U goveđem mlijeku nalazi se Cu-ZnSOD (ASADA, 1976.; KORYCKA-DAHL i sur., 1979.). U ljudskom mlijeku utvrđena je aktivnost Mn-SOD (KIYOSAWA i sur., 1993.). Aktivnost SOD u mlijeku višestruko je manja nego SOD u goveđoj krvi (FILIPOVIĆ i sur., 2005; HAMED i sur., 2008). Aktivnost ovog enzima u ljudskom mlijeku je 2 do 2,3 puta veća nego u goveđem mlijeku (KIYOSAWA i sur., 1993.). Smatra se da aktivnost SOD u kravljem mlijeku nije pod utjecajem perioda laktacije ili starosti krava, te ne varira između jutarnje i noćne mužnje, a ne korelira s promjenom BSS (HICKS, 1980.; HAMED i sur., 2008). U ovom istraživanju u mlijeku koza zabilježene su oko 130% veće aktivnosti SOD u odnosu na mlijeko krava. Nisu utvrđene razlike u aktivnosti SOD usporedbom mikrobiološki pozitivnih i negativnih uzoraka mlijeka kod obje vrste životinja.

Za razliku od rezultata ovog istraživanja ELSAMI i sur. (2015.) utvrdili su kod štakora smanjenje aktivnosti SOD-a u serumu, mlijeku te tkivu zahvaćenom mastitisom, u usporedbi sa zdravim štakorima. Tijekom aplikacije propolisa kao i nakon aplikacije u uzorcima mlijeka kod obje vrste životinja nisu utvrđene značajne varijacije u aktivnosti ovog enzima što govori u prilog tome kako ovaj pokazatelj nije dobar marker intenziteta oksidacijskog stresa u upali mliječne žlijezde vjerojatno stoga što ne korelira s porastom BSS.

Radi procjene antioksidativnog kapaciteta bioloških uzoraka razvijeni su različiti testovi koji mjere ukupan antioksidacijski kapacitet kao npr. TAS *(engl.total antioxidant status)* od tvrtke Randox, mjerenje antioksidacijskog potencijala s elektronskom spinskom rezonancijom itd. U ovom radu korištena je metoda biološkog antioksidacijskog potencijala BAP tvrtke Diacron (Italija). Ovom metodom dobivamo uvid u dinamičku ravnotežu između prooksidansa i antioksidansa u plazmi (GHISELLI i sur., 2000.). Kod pasa u plazmi je utvrđena koncentracija 2,446±0,585 mmol/L (PASQUINI i sur., 2008.), a u ljudi >2,200 mmol/L (DOHI i sur., 2005.). U uzorcima mlijeka koza i krava u ovom istraživanju utvrdili smo koncentraciju BAP u rasponu 2,844-6,949 mmol/L uz prosječnu vrijednost 6,210 ± 0,38 mmol/L, dok su prosječnu vrijednost BAP u mlijeku ljudi iznosile 3,807 ± 0,103 mmol/L (EZAKI i sur. 2008.). Mlijeko iz supklinički zaražene mliječne žlijezde podliježe

oksidacijskom stresu što može rezultirati značajnim smanjenjem antioksidativnih svojstava mlijeka što je utvrdila SILANIKOVE i sur. (2014.) u mlijeku koza. U ovom istraživanju u mikrobiološki pozitivnim uzorcima prije aplikacije propolisa nije utvrđena manja koncentracija BAP u odnosu na uzorke iz zdravih četvrti/polovica vimena.

U ovom istraživanju aplikacija propolisa u mikrobiološki pozitivne četvrti/polovice vimena uzrokovala je smanjenje koncentracije BAP kod krava 24 sata i 7 dana, odnosno 12 sati i 24 sata nakon prve aplikacije propolisa kod koza. Razlozi smanjenja BAP pri aplikaciji propolisa nisu jasni te su potrebna daljnja istraživanja.

Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima i koncentracije malondialdehida (MDA) ubraja se među najčešće korištene metode za utvrđivanje oksidacijskog stresa. Povećana koncentracija MDA u plazmi smatra se markerom lipidne peroksidacije (ELSAMI i sur., 2015.). U ovom radu intenzitete oksidacijskih procesa mjeren je metodom d-ROM u kojoj reaktivni kisikovi metaboliti (primarno hidroperoksidi ROOH) u prisustvu željeza generiraju alkoksilne (Ro*) i peroksilne (R-OO*) radikale čija se koncentracija mjeri fotometrijski te je u tom smislu d-ROM metoda koja daje bolji uvid u koncentraciju ROS negoli MDA. Fiziološki raspon vrijednosti reaktivnih kisikovih metabolita kod ljudi u plazmi, dobivenih d-ROM testom kreću se između 250 i 300 U CARR (odgovara rasponu između 20.00 i 24.00 mg H_2O_2/dL). Koncentracija d-ROM u plazmi pasa iznosi 73,9±8,78 CARR U (PASQUINI i sur., 2008). U ovom istraživanju u mikrobiološki negativnim uzorcima mlijeka krava utvrđene vrijednosti d-ROM bile su do 2,5 puta veće negoli u plazmi ljudi (DOHI i sur., 2005.). U mlijeku koza koje je pripremljeno na jednak način kao i mlijeko krava koncentracija d-ROM je bila nemjerljiva. Razloge ovakvog nalaza mogli bismo potražiti u različitom sastavu mlijeka krava i koza, vjerojatno neki od spojeva u mlijeku koza interferira u reakciji hidroperoksida sa željezom iz mlijeka u sintezi alkoksilnih i peroksilnih radikala. Stoga bi za procjenu koncentracije ROS u mlijeku koza trebalo izabrati neku drugu metodu.

Kod proizvodnih životinja oksidacijski stres, odnosno porast koncentracije ROS zabilježen je tijekom ranog postpartalnog razdoblja (CELI, 2011.). ELSAMI i sur. (2015.) utvrdili su kod štakora povećanu koncentraciju MDA u serumu, mlijeku te tkivu zahvaćenom mastitisom, u usporedbi sa zdravom skupinom. Ove promjene povezane su s povećanjem koncentracije MDA nastale i zbog povećanja razine hidroksi radikala oslobođenih iz neutrofila u mastitisom zahvaćenoj mliječnoj žlijezdi (ELSAMI i sur., 2015.).

U ovom istraživanju nismo utvrdili značajne razlike u koncentraciji d-ROM između mikrobiološki negativnih i pozitivnih uzoraka mlijeka krava prije aplikacije propolisa.

ATROSHI i sur. (1996.) u krava s mastitisom i KIZIL i sur. (2007.) u kozu s mastitisom uzrokovanim *M. agalalactiae* utvrdili su visoku razinu MDA u krvi.

Aplikacija propolisa u mikrobiološki pozitivne četvrti krava 12 i 24 sata od prve aplikacije propolisa uzrokovala je smanjenje koncentracije ROM. GONZALEZ i sur. (1994.) su utvrdili kako 95% etanolni ekstrakt propolisa u dozi od 5, 10 i 25 mg/kg primijenjen intraperitonealno u miševa, značajno smanjuje razinu malondialdehida u jetri. Naši rezultati potvrđuju antioksidacijski učinak propolisa (PASCUAL i sur., 1994.; NIJVELDT i sur., 2001.; BANSKOTA i sur., 2001.).

U literaturi postoji mali broj podataka o utjecaju doze propolisa na antioksidacijski status *in vivo* u smislu zaštitnog odnosno štetnog djelovanja (ICHIKAWA i sur., 2002). Tako je, SABOČANEC, (2006.) u tkivima štakora utvrdila kako nativni propolis pokazuje doznu ovisnost, u manjoj dozi ima antioksidacijski učinak, a u većoj dozi prooksidacijski učinak. Pozitivan učinak propolisa pokazan je u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine, gdje je propolis smanjio intenzitet lipidske peroksidacije u svim ispitanim tkivima (jetri, plućima i mozgu), dok u dozi od 300 mg kg^{-1} tjelesne težine nije imao nikakav učinak niti u jednom od ispitivanih organa (SABOČANEC, 2006.).

Dozna ovisnost pripravaka koji se koriste preventivno kao dodatak prehrani važan je podatak jer se dugo smatralo da antioksidansi, kao npr. vitamin C i E uvijek djeluju zaštitno, tj. da nemaju prooksidacijskih svojstava bez obzira na dozu. Međutim, sve je više literaturnih podataka koji ukazuju na štetno (prooksidacijsko) djelovanje antioksidansa u višim dozama, a što se poglavito odnosi na vitamin C u povećanoj dozi (KADIISKA i sur., 1995.; PORTER, 1995.).

Propolis je u upotrebi više od 2000 godina. Korišten je za balzamiranje i mumificiranje, dok su ga Grci i Rimljani koristili u liječenju raznih kožnih bolesti (CRANE, 1999.). Upotrebu propolisa u liječenju mastitisa istraživali su FIORDALISI i sur. (2016.). Rezultati pokazuju potencijal brazilskog propolisa u liječenju mastitisa kod krava, iako je učinkovitost ovisna o zemljopisnom podrijetlu i koncentraciji. Upotrebljavajući propolis hrvatskog podrijetla iz područja Dalmacije u obliku 1% inovativne intramamarne bezalkoholne otopine kod krava utvrdili smo uklanjanje uzročnika mastitisa iz uzoraka mlijeka nakon druge aplikacije te time 100% uspješnost antibakterijskog djelovanja 1% propolisa. Kod koza upotrebom 5% formulacije nativnog propolisa u polietilenglikolu utvrdili smo smanjenje broja mikrobiološki pozitivnih uzoraka u 73% slučajeva što propolis u ovom obliku čini vrlo dobrim pripravkom za liječenje supkliničkih mastitisa.

Učinak propolisa temelji se na uništavanju kemijskog i strukturnog integriteta biofilma sojeva *S. aureus* i *E. coli* rezistentnih na antibiotike, te se njegovo djelovanje na ove sojeve zaštićene biofilmom može usporediti s kationskim antimikrobnim peptidima koji imaju citotoksični učinak remeteći strukturu stanične membrane mikroorganizama i time mijenjajući propusnost i proizvodnju energije u njima (BRYAN i sur., 2016.).

Istraživanje je načinjeno na malom broju životinja odnosno uzoraka mlijeka iz četvrti/polovica zahvaćenih supkliničkim mastitisom. Uzročnici mastitisa bili su različiti. Rezultati koje smo dobili u radu imaju vrijednost, no istraživanje bi trebalo ponoviti na većem uzorku.

6. ZAKLJUČCI

1. U uzorcima mlijeka koza i krava utvrđene su vrsne specifičnosti u koncentraciji/aktivnosti antioksidacijskih pokazatelja i koncentracije d-ROM pri čemu je aktivnost GSH-Px, i SOD bila viša kod koza nego kod krava, a u uzorcima mlijeka koncentracija d-ROM nije bila mjerljiva. Ove razlike su vjerojatno posljedica različitog sastava mlijeka, udjela i vrsta masnih kiselina prisutnih u mlijeku koza.

2. Aplikacija propolisa dovela je do porasta aktivnosti GSH-Px kao i porasta omjera GSH-Px/SOD u mlijeku koza nakon prve aplikacije vjerojatno zbog porasta BSS (neutrofila) i porasta koncentracije vodikovog peroksida.

3. Aplikacija propolisa dovela je do manje koncentracije BAP u mlijeku obje vrste životinja vjerojatno zbog smanjenja drugih komponenti antioksidacijskog sustava.

4. Aplikacija dvije doze propolisa kod krava dovela je do smanjenja koncentracije d-ROM u mlijeku tretiranih životinja što možemo pripisati antioksidacijskom učinku propolisa.

5. Aktivnost SOD tijekom istraživanja bila je stalna tako da ovaj enzim ne možemo smatrati markerom supkliničkog mastitisa.

6. Nakon trokratne aplikacije 1% propolisa u četvrti krava koje su bile zahvaćene supkliničkim mastitisom svi pretraženi uzorci mlijeka bili su mikrobiološki negativni što možemo pripisati antimikrobnom učinku propolisa.

7. Nakon trokratne aplikacije 5% propolisa u polovice vimena koza koje su bile zahvaćene supkliničkim mastitisom 73% pretraženih uzoraka mlijeka bilo je mikrobiološki negativno što možemo pripisati antimikrobnom učinku propolisa.

7. POPIS LITERATURE

1. Anonymus (2017): Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka. Narode novine 27/2017.
2. ASADA K., M. TAKAHASHI, M. NAGATE (1974): Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agric. Biol. Chem. 38, 471-473.
3. ATAKISI, O., H. ORAL, E. ATAKISI, O. MERHAN, S. METIN PANCARCI, A. OZCAN, S. MARASLI, B. POLAT, A. COLAK, S. KAYA (2010): Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. Res. Vet. Sci. 89, 10-13.
4. ATROSHI, F., J. PARANTAINEN, S. SANKARI (1996): Changes in inflammation-related blood constituents of mastitic cows. Vet. Res. 27, 125-132.
5. BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet, Zagreb
6. BANSKOTA, A., Y. TEZUKA, S. KADOTA (2001): Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother Res. 15, 561-571.
7. BERMEJO, P., R. DOMINGUEZ, A. BERMEJO (1997): Direct determination of Fe and Zn in different components of cow milk by FAAS with a high performance nebulizer. Talanta 45, 325-330.
8. BOUWSTRA, R. J., M. NIELEN, J. R. NEWBOLD, E. H. J. M. JANSEN, H. F. JELINEK, T. VAN WERVEN (2010): Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. J. Dairy. Sci. 93, 5696-5706.
9. BRADLEY, A. (2002): Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164, 116-128.
10. BRYAN, J., P. REDDEN, C. TRABA (2016): The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 62, 192-198.
11. BURDOCK, G.A. (1998): Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food and Chem. Toxicol. 36, 347-363.
12. CELI, P. (2011): Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. Immunopharmacol. Toxicol. 33, 233-240.
13. CRANE, E. (1999): The world history of beekeeping and honey hunting. Eva Crane London, 161-323.

14. DEBSKI, B., M. F. PICCIANO, J. A. MILNER (1987): Selenium content and distrusting of human, cow and goat milk, J. Nutr. 117, 1091-1097.
15. DOHI K., K. SATOH, H. OHTAKI, S. SHIODA, Y. MIYAKE, M. SHINDO, T. ARUGA (2005): Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. InVivo, 19 (5), 855-860.
16. ELSAMI, H., R. BATAVANI, S. REZEI, R. HOBBENAGHI (2015): Changes of stress oxidative enzymes in rat mammary tissue, blood and milk after experimental mastitis induced by *E. coli* lipopolysaccharide. Vet. Res. Forum 6, 131-136.
17. ERSKINE, R. J., S. WAGNER, F. J. DEGRAVES (2003): Mastitis therapy and pharmacology. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 19, 109-138.
18. EZAKI, S., T. I. KEIJI SUZUKI, M. TAMURA (2008): Association between Total Antioxidant Capacity in Breast Milk and Postnatal Age in Days in Premature Infants. J. Clin. Biochem. Nutr. 42, 133–137.
19. FILIPOVIĆ D., A. NIĆIFOROVIĆ, J. KASAPOVIĆ, S. PEJIĆ, S. B. PAJOVIĆ, M. B. RADOJČIĆ (2005): Superoxide dismutase activity in various factions of full bovine milk. Acta Aliment. 34, 219-226.
20. FIORDALISI, S. A. L., L. A. HONORATO, M. R. LOIKO, C. A. M. AVANCINI, M. B. R. VELEIRINHO, L. C. P. M. FILHO, S. KUHNEN (2016): The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. J. Dairy Sci. 99, 2308-2318.
21. GHISALBERTI, E. L. (1979): Propolis: A review bee world 60, 59-84.
22. GHISELLI A., M. SERAFINI, F. NATELLA, C. SCACCINI (2000): Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free. Radical. Biol. Med. 29, 1106-1114.
23. GONZALES, R., I. CORCHO, D. REMIREZ, S. RODRIGUEZ, A. GONZALES, O. ANCHETTA, N. MERINO, C.PASCUAL (1994): Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. Phytotherapy Res. 8, 229-232.
24. HAMED, H., A. EL FEKI, A. GARGOURI (2008): Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. C. R. Biologies 331, 144-151.
25. HICKS, C.L., (1980): Occurrence and consequence of superoxide dismutase in milk products: a review. J. Dairy Sci. 63, 1199-1204.
26. HOJO, Y. (1986): Sequential study on glutathione peroxidase selenium contents of human milk, Total Environ. 52, 83-91.

27. ICHIKAWA, S., K. SATOH, T. TOBE, I. YASUDA, F. USHIO, K. MATSUMOTO, K. ENDO, C. OOKUBO (2002): Free radical scavenging activity of propolis. Redox Rep. 7(5), 347-350.
28. KADIISKA M. B., M. J. BURKITT, Q. H. XIANG, R. P. MASON (1995): Iron supplementation generates hydroxyl radical *in vivo*. An ESR spin-trapping investigation. J. Clin. Invest. 96, 1653- 1657.
29. KEHRER, J.P. (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 149, 43-50.
30. KIYOSAWA I., J. S. N.MATUYAMA (1993): Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrums and mature milk. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 676-677.
31. KIZIL, O., H. OZDEMIR, M. KARAHAN (2007): Oxidative stress and alterations of antioxidant status in goats naturally infected with Mycoplasma agalactiae. Revue Med. Vet. 158(6), 326-330.
32. KORYKA-DAHL M., T. RICHARDSON, C.L. HICKS (1979): Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. J. Food Prot. 42, 867-871.
33. KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, YU. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. Journal of Ethnopharmacology 64, 235-240.
34. MANSSON H. L., B. AKESSON (2000): Antioxidative factors in milk. Br. J. Nutr. 84, 103-110.
35. MCDOUGALL, S. M. A. BRYAN, R. M. TIDDY (2009): Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. J. Dairy Sci. 92, 4421-4431.
36. MORALES, A.E., A. PEREZ-JIMENEY, M.C. HIDALGO, E. ABELLAN, G. CARDENETE (2004): Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 139, 153-161.
37. NIELSEN, C., S. OSTERGAARD, U. EMANUELSON, H. ANDERSSON, B. BERGLUND, E. STRANDBERG (2010): Economic consequences of mastitis and withdrawal of milk with high somatic cell count in Swedish dairy herds. Animal 4, 1758-1770.

38. NIJVELDT, R.J., E.van NOOD, D. van HOORN, P.G. BOELENS, K. van NORREN, P.A. van LEEUWEN (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin.Nutr. 74, 418-425.
39. OLIVER, S. P., B. E. GILLESPIE, S. J. HEADRICK, H. MOOREHEAD, P. LUNN, H. H. DOWLEN, D. J. JOHNSON, K. C. LAMAR, S. T. CHESTER, W. M. MOSELEY (2004b): Efficacy of extended Ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. J.Dairy Sci. 87, 2393-2400.
40. OLTENACU, P. A., B. ALGERS (2005): Selection for increased production and the welfare of dairy cows: are new breeding goals needed? Ambio 34, 311-315.
41. PARK, Y. (2010): Goat Milk: Composition, Characteristics. Encyclopaedia of Animal Science. W.G. Pond and N. Bell, 2nd Edition.Taylor and Francis. CRC Press. Boca Raton, FL.
42. PASCUAL, C., R. GONZALEZ, R. G. TORRICELLA (1994): Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J. Ethnopharmacol. 41, 9-13.
43. PASQUINI, A., E. LUCHETTI, V. MARCHETTI, G. CARDINI, E. L. IORIO (2008): Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. Vet. Res. Commun. 32, 137-143.
44. PINTIĆ, N., A. DAKIĆ, F. POLJAK, D. STRUČIĆ, V. TOMŠE-ĐURANEC, T. JELEN, V. PINTIĆ (2006): Učestalost pojave antibiotika i drugih antibakterijskih tvari u mlijeku isporučenom za tržište. Stočarstvo 2, 83-95.
45. PORTER W.L. (1995): Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. Tox. Ind. Health. 9, 93-122.
46. RUEGG, P. L. (2009.): Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J. Anim. Sci. 87, 43-55.
47. RUEGG, P. L., J. C. F. PANTOJA (2013): Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. Irish J. Agr. Food Res. 52, 101-117.
48. SABOČANEC, S. (2006): Učinak propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u CBA miša. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
49. SANDGREN, C. H., K. PERSSON WALLER, U. EMANUELSON (2008): Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. The Vet. J. 175, 108-117.
50. SANTANA, H. F., A. A. BARBOSA, S. O. FERREIRA, H. C. MANTOVANI (2012): Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 485-491.

51. SAYEED, I., S. PARVEZ, S.PANDEY, B. BIN-HAFEEZ, R. HAQUE, S. RAISUDDIN (2003): Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish. Ecotoxic. Envir. Safety. 56, 295-301.
52. SHIMIZU, K., H. ASHIDA, Y. MATSUURA, K. KANAZAWA, (2004): Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. Arch. Biochem. Biophys. 424, 181-188.
53. SILANIKOVE, N., U. MERIN, F. SHAPIRO, G. LEITNER (2014): Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. J. Dairy Sci. 97, 3449-3455.

8. SAŽETAK

Oksidacijska stabilnost mlijeka krava i koza nakon intramamarne aplikacije propolisa

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj 1% i 5% bezalkoholne otopine propolisa primijenjene intramamarno u liječenju supkliničkih mastitisa na antioksidacijska svojstva mlijeka krava i koza. Pripravak 1% nativnog propolisa apliciran je mliječnim kravama trokratno u sve četvrti vimena i to poslije jutarnje mužnje, poslije večernje mužnje te sljedeći dan poslije jutarnje mužnje. Koze čije je mlijeko bilo mikrobiološki pozitivno podijeli smo u dvije skupine. Jednoj skupini koza trokratno smo aplicirali intramamarno otopinu 5% nativnog propolisa, dok smo drugoj skupini trokratno aplicirali intramamarnu suspenziju antibiotika klavuxila. U mlijeku su određene aktivnosti glutation peroksidaze, superoksid dismutaze, biološki antioksidacijski potencijal te koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita, kao pokazatelja oksidacijskog statusa. U uzorcima mlijeka koza aktivnost GSH-Px, SOD bila viša nego kod krava, a u uzorcima mlijeka koza koncentracija d-ROM nije bila mjerljiva. Aplikacija propolisa dovela je do porasta aktivnosti GSH-Px kao i porasta omjera GSH-Px/SOD u mlijeku koza nakon prve aplikacije te smanjenja koncentracije BAP u mlijeku obje vrste životinja. Aplikacija dvije doze propolisa kod krava dovela je do smanjenja koncentracije d-ROM u mlijeku tretiranih životinja dok se aktivnost SOD tijekom istraživanja nije mijenjala. Nakon trokratne aplikacije 1% propolisa u četvrti krava koje su bile zahvaćene supkliničkim mastitisom svi pretraženi uzorci mlijeka bili su mikrobiološki negativni, a kod koza 73% pretraženih uzoraka mlijeka bilo je mikrobiološki negativno. Aplikacijom propolisa dokazan je antioksidacijski i antimikrobni učinak propolisa apliciranog putem intramamarne formulacije.

Ključne riječi: mlijeko, krave, koze, supklinički mastitis, propolis

9. SUMMARY

Oxidative stability of cow and goat milk after intramammary application of propolis

The aim of this study was to exemine effect of 1% and 5% non-alcoholic solution of propolis applied intramammary during treatment of subclinical mastitis on antioxidant properties of cow and goat milk. Solution of 1% native propolis was administered to milking cows three times in all four quarters of udder, after morning milking, after evening milking and next day after morning milking. Goats with positive microbiological findings was divided in two groups. First group was treated with 5% solution of native propolis intramammary three times, while the second group was treated with antibiotic klavuxil three times. Activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase, biological antioxidant potential and concentration of the reactive oxygen metabolites ware determined in milk. In samples of goat milk activity of GSH-Px and SOD was higher than in cow milk, while concentration of d-ROM in goat milk was not mesasurable. Application of propolis resulted in higher activity of GSH-Px and also higher ratio of GSH-Px/SOD in goat milk after first application, while in both goat and cow milk concentration of BAP was lower. Application of two doses of propolis in cows resulted in lower d-ROM concentration in milk of treated animals while activity od SOD during study show no changes. After applications of 1% propolis three times in udder quarters that were affected with subclinical mastitis, all samples of cow milk were microbiologically negative, while 73% of goat milk samples were microbiologically negative. Application of propolis confirmed antioxidant and antimicrobial effect of intramammary formulation of propolis.

Keywords: milk, cows, goats, subclinical mastitis, propolis

POPIS KRATICA

SOD - superoksid- dismutaza

GSH-Px - glutation- peroksidaza

ROM - reaktivni metaboliti kisika *(engl. reactive oxygen metabolites)*

BAP - biološki antioksidacijski potencijal

SCC - broj somatskih stanica *(engl. somatic cell count)*

TAS - ukupni antioksidacijski status *(engl. total antioxidant status)*

MDA - malondialdehid

KAT - katalaza

GSH - glutation

GSSG - glutation disulfid

EEP - etanolni ekstrakt propolisa

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat *(engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)*

POPIS TABLICA

Tablica 1. Razvrstavanje mlijeka u razrede prema broju mikroorganizama i somatskih stanica

Izvor: Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka NN 27/2017.

Tablica 2. Sastav koncentrata za koze sa 16% proteina (prema deklaraciji proizvođača)

Izvor: http://www.belje.hr/tvornica-stocne-hrane-belje/proizvodi-za-ostale-zivotinje/

Tablica 3. Sastav vitaminsko-mineralnog dodatka Ovisan®

Izvor: http://www.sano.hr/hr/product/ovisanr

Tablica 4. Sirovine za standardnu smjesu za muzne krave proizvodnje 20 litara mlijeka
Izvor: BOSGEN d.o.o.

Tablica 5. Sirovine za standardnu smjesu za muzne krave proizvodnje 40 litara mlijeka
Izvor: BOSGEN d.o.o.

Tablica 6. Sastav standardne smjese muznih krava po kg proizvedenog mlijeka

Izvor: BOSGEN d.o.o.

Tablica 7. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u mlijeku koza tretiranih trokratnomaplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (U/L)

Tablica 8. Biološki antioksidacijski potencijal (BAP) u mlijeku koza tretiranih trokratnomaplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (mmol/L)

Tablica 9. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila (U/ml)

Tablica 10. Omjer glutation peroksidaze i superoksid dismutaze (GSH-Px/SOD) u mlijeku koza tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravcima 5% propolisa i klavuxila

Tablica 11. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U/L)

Tablica 12. Biološki antioksidacijski potencijal (BAP) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (mmol/L)

Tablica 13. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (ROM) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U CARR)

Tablica 14. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa (U/mL)

Tablica 15. Omjer glutation peroksidaze i superoksid dismutaze (GSH-Px/SOD) u mlijeku krava tretiranih trokratnom aplikacijom intramamarnim pripravkom 1% propolisa

POPIS ILUSTRACIJA

Slika 1. Reprezentativni kromatogram spojeva utvrđenih u ekstraktu propolisa na Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Slika 2. Vrijednosti BSS-a nakon aplikacije 1%-tne bezalkoholne otopine propolisa

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. prosinca 1991. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnu školi Okučani završila sam s odličnim uspjehom, te upisala Srednju školu Matija Antun Reljković, smjer veterinarski tehničar u Slavonskom Brodu koju sam također završila s odličnim uspjehom. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja aktivno sam volontirala u veterinarskoj ambulanti u Slavonskom Brodu. U četvrtom razredu srednje škole osvojila sam 2. mjesto na Državnom natjecanju učenika iz Obrazovnog sektora poljoprivrede, prehrane i veterine u natjecateljskoj disciplini veterinarski tehničar. Na ljeto 2010. godine upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te apsolventicom postajem 2016. godine. Upoznata s mnogim područjima veterinarske medicine najviše me zainteresirao područje rada s farmskim životinjama i konjima, te iz toga razloga ovaj diplomski rad sam odlučila posvetiti prevenciji i tretmanu mastitisa, kao jednom od vodećih zdravstvenih problema visokoproizvodnih životinja.