Utjecaj imunostimulansa Natramune TM na oksidacijski stres klena (Squalius cephalus L.)

Pofuk, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:675830

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Matija Pofuk

UTJECAJ IMUNOSTIMULANSA NATRAMUNE™ NA OKSIDACIJSKI STRES KLENA (*Squalius cephalus* L.)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij: Ribarstvo i lovstvo

Matija Pofuk

UTJECAJ IMUNOSTIMULANSA NATRAMUNE™ NA OKSIDACIJSKI STRES KLENA (*Squalius cephalus* L.)

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Daniel Matulić

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad ocijenjen je i obranjen dana _____ s ocjenom _____ pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Daniel Matulić _____

2. Doc. dr. sc. Tea Tomljanović _____

3. Prof. dr. sc. Ivica Aničić _____

ZAHVALA

Zahvaljujem se SVIM zaposlenicima “Bijele vile” (Zavod za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju, Agronomski fakultet) na ukazanom povjerenju, strpljenju, podršci i ljubaznosti tijekom studija, a naročito mentoru doc.dr.sc. Danielu Matuliću koji mi je savjetima pomogao pri provedbi istraživanja te (u konačnici) u oblikovanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim prijateljima koji su vjerovali u mene te im se ovim putem ispričavam na posvećenoj manjoj pažnji tijekom godina moga studiranja.

Također i Vidi Čadež, dr. sc. (IRB) zahvalio bi što je nesebično dijelila pristupe informacijama koje su mi uvelike pomogle tijekom studija.

Veliku zahvalu upućujem Luki Mrvičiću, koji svoju ljubav, strast i znanje o ribolovu, neumorno prenosi na mene; Ani Mariji Jakšić, koja mi je svojim entuzijazmom i zaluđenošću prema znanosti istu i približila te Lidiji Svečnjak, dr. sc., na mnogim savjetima i izmjenama razmišljanja vezanim za aspekte akademskog i socijalnog života.

Više nego svima, zahvaljujem se svojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori bez koje početak i završetak mog studija ne bi bio moguć.

Ovaj rad posvećujem pokojnom djedu, Andriji Pofuku, dipl. iur., koji me, iako nisam krenuo njegovim stopama, podržavao do samog kraja svog života. Tvoja velika žrtva, trud i odricanje, omogućili su mi veće mogućnosti i lagodan život. ´Fala ti deda...

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Diplomski rad

UTJECAJ IMUNOSTIMULANSA NATRAMUNE^{TM} NA OKSIDACIJSKI STRES KLENA (*Squalius cephalus* L.)

Matija Pofuk

SAŽETAK

Proveden je hranidbeni pokus u trajanju od 43 dana u kojem je istraživan utjecaj oligosaharida iz proizvoda Natramune^{TM} na oksidacijski stres kod juvenilne kategorije klena (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758) inicijalne prosječne težine od 7,4 g. Granuliranoj hranidbenoj smjesi (28,7% SP) pridodan je imunostimulans u koncentracijama od 1%, 3% i 5%. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da je uključenje imunostimulansa u hranidbu varijabilno utjecalo na koncentraciju malonaldehida u mišićnom tkivu riba. Najniža razina MDA u tkivima uočena je u grupi hranjenoj s 1% (D1). Izloženost stresu, oboljenja u fazi pokusa, loša adaptacija na hranu, te mortaliteti kod riba u pokusu mogući su uzroci visoke varijabilnosti rezultata unutar i između hranidbenih skupina.

Ključne riječi: klen, imunostimulans, oksidacijski stres, malondialdehid

DOCUMENTAL CARD

University of Zagreb

Faculty of Agriculture

Master thesis

THE EFFECT OF IMMUNOSTIMULANS NATRAMUNE^{TM} ON OXIDATIVE STRESS IN CHUB (*Squalius cephalus* L.)

Matija Pofuk

ABSTRACT

A forty three day feeding trial was conducted on evaluating the effects of different concentrations of oligosaccharides derived from Natramune^{TM} on juvenile chub (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758) (initial weight 7,4 g). In the basal diet (28,7% CP) was added Natramune^{TM} at levels of 1%, 3% and 5% to determine the effects on levels of malondialdehyde (MDA) in muscle tissue. The research results indicate that the inclusion of immunostimulans in the feed variably affected malondialdehyde concentrations in muscle tissue of fish. The lowest level of MDA was observed in the group fed with 1% (D1) of immunostimulans. Exposure to stress, disease in the experimental stage, poor adaptation to feed and mortality of fish during the feeding trials could be related to the high variability of results within and between experimental groups.

Key words: chub, immunostimulans, oxidative stress, malondialdehyde

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Biologija i ekologija klena 1
1.2. Recirkulacijski akvakulturni sustav (RAS) 4
1.3. Oksidativni stres 4
1.4. Imunostimulacija u akvakulturi 5
1.4.1. Imunosni sustav riba 6
1.4.2. Vrste i oralna aplikacija imunostimulansa 6
2. MATERIJALI I METODE 8
2.1. Riba i pokusni uvjeti 8
2.2. Hranidbeni pokus 10
2.3. Mjerenje koncentracije MDA 11
2.4. Statistička analiza podataka 13
3. REZULTATI 14
3.1. Fizikalno-kemijski parametri vode i mortaliteti 14
3.2. Marker oksidativnog stresa – malondialdehida (MDA) 14
4. RASPRAVA 16
5. ZAKLJUČCI 21
6. POPIS LITERATURE 22

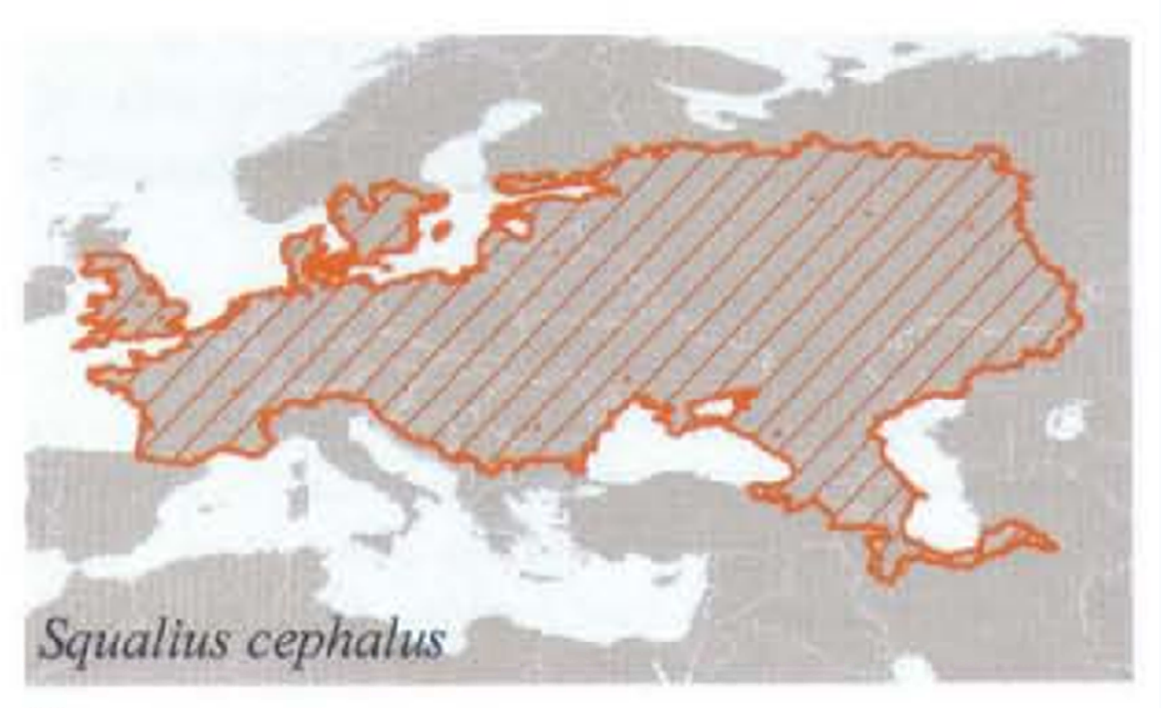
1. UVOD

Uvjeti u komercijalnoj akvakulturi često uključuju stanja visokoga stresa, primjerice visoke gustoće nasada, manipulativne radnje (sortiranje, inducirani mrijest, vakcinacija, transport), poremećaje u životnoj sredini (akumulacija otpada, proliferacija flore i faune, razine kisika, temperatura), izloženost suncu, itd. Takva stanja često pomažu ulazak raznim patogenima u uzgajani organizam. Najčešći oblik prevencije i zaštite u komercijalnoj akvakulturi je uporaba antibiotika. Međutim, antibiotici mogu izazvati bioakumulaciju u ribljem tkivu, slabljenje imunosnog sustava, stvaranje otpornijih sojeva bakterija i uništavanje ambijentalne mikroflore (Özlüer-Hunt i sur., 2011). Iz tog razloga istraživanja se usmjeravaju prema pronalasku alternativnih načina obrane imunološkog sustava uzgajanih organizama (poput probiotika), koji imaju indirektan utjecaj i na poboljšani rast. Pretpostavka provedenog istraživanja bila je da će dodavanje različitih koncentracija imunostimulansa u hranu imati pozitivne utjecaje na imunosni sustav i performanse rasta klena. Iako se pratila i performansa rasta ribe, u ovom dijelu istraživanja osvrt je naglašen na imunostimulirajućem efektu hranidbenog suplementa. . Dobiveni podaci mogli bi pomoći u daljnjim istraživanjima prirodnih izvora imunomodulirajućih komponenti s praktičnom primjenom u akvakulturi.

1.1. Biologija i ekologija klena

Klen, *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758), koštunjava je riba smještena u razred zrakoperki (*Actinopterygii*), red šaranki (*Cypriniformes*), porodicu šaranki (*Cyprinidae*), te rod *Squalius*. Sistematika rodova *Squalius* i *Leuciscus* nije u potpunosti riješena. Nekoliko vrsta klena južne Europe imaju sličnu morfologiju pa su ih autori proteklih godina identificirali svojstvom široke rasprostranjenosti (Kottelat i Freyhof, 2007). Danas, mnoge vrste prvotno smiještane u rod *Leuciscus*, sada taksonomski pripadaju rodovima *Squalius*, *Telestes* i *Petroleuciscus* (Kottelat i Freyhof, 2007). Naseljava slivove Sjevernog, Baltičkog, sjevernog Crnog, Bijelog, Barentsovog i Kaspijskog mora, atlantski sliev do rijeke Adour (Francuska), Veliku Britaniju sjeverno do 56 °N, južnu Finsku, Švedsku sjeverno do Stockholma,

mediteranski sliv između rijeka Var i Herauld (Slika 1) (Kottelat i Freyhof, 2007).



Slika 1. Rasprostranjenost klena (iz Kottelat i Freyhof, 2007)

Prirodno odsutan iz Italije i rijeka jadranskog sliva. Od nedavno je zabilježen i u Irskoj, gdje se smatra alohtonom vrstom (Caffrey i sur., 2008). Najobilniji u malim rijekama i velikim potocima u zoni mrene s brzacima i sporo tekućim dubljim bazenima. Naseljava i umjereno brzo tekuće do sporo tekuće dijelove velikih nizinskih rijeka. Zabilježen je i u planinskim potocima i velikim jezerima iz kojih za vrijeme mrijesta migrira u obližnje pritoke (Kottelat i Freyhof, 2007), te u bočatoj vodi (Muus i Dahlstrom, 1999). Tijelo je prekriveno krupnim ljuskama na kojima, osim reda tamnih rubova, nema ili ima vrlo malo pigmenta (Kottelat i Freyhof, 2007). Tijelo mu je vretenastog oblika, s tamnozelenim leđima i srebrnastim bokovima. Prsne peraje su narančaste, a trbušne i podrepna peraja crvenkaste boje. Postiže dužine preko 60 cm (Kottelat i Freyhof, 2007), dok je maksimalna zabilježena masa 8 kg (Spillman, 1961). Mužjaci se mrijeste prvi puta s 2-4 godine, dok ženke s 4-6 godina. Ikra je ljepljiva, te ju ženke odlažu na kamenje u brzo-tekućoj vodi. Klen se mrijesti u nekoliko serija (do 3 puta) od svibnja do kolovoza (Nunn i sur., 2002) dok se temperature dignu iznad 14 °C (Kottelat i Freyhof, 2007). Ishrana klena sastoji se od različitih razvojnih stadija akvatičnih i terestričnih kukaca, rakova, mekušaca, riba, biljnog

materijala i detritusa (Kottelat i Freyhof, 2007), ovisno o dobnoj kategoriji, godišnjem dobu, te biotopu koji naseljava. Klen zasada nema osobitu ekonomsku vrijednost u akvakulturi, ali je zato popularna riblja vrsta među sportskim ribolovcima (Slika 2).



Slika 2. Klen *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758) (iz Kottelat i Freyhof, 2007)

1.2. Recirkulacijski akvakulturni sustav (RAS)

Sve veća ograničenja u kvantiteti i kvaliteti vode, smanjenje povoljnih površina za uzgoj, te pitanja onečišćenja okoliša dovela su do razvijanja recirkulacijske tehnologije za uzgoj akvatičnih organizama. Kako bi se uspostavila potpuna kontrola nad svim važnim ekološkim čimbenicima određenih uzgajanih vrsta, te uvelike umanjila potrošnja vode, recirkulacijski akvakulturni sustavi su razvijani od početka 80-ih godina. Danas je tehnologija standardizirana i nezaobilazna u uzgoju ličinačkih stadija i mlađi morskih riba u mrjestilištima. Recirkulacijskom tehnologijom danas se uzgaja nekoliko vrsta slatkovodnih i morskih riba (npr. afrički som, jegulja, pastrva, losos, romb, lubin, list) (Martins i sur., 2010). Recirkulacijska tehnologija podrazumijeva sustav protoka u kojem se voda opetovano koristi nakon niza predtretmana, filtracijskih postupaka, sterilizacije, zagrijavanja, te oksigenacije. Tipičan scenarij postupaka obrade vode u RAS uključuje: dekantaciju, tj. taloženje i odstranjivanje krutog otpada (čestice >200 µm); mehanička filtracija, kojom se odstranjuju fine frakcije suspendirajućih čestica (<100 µm); biološka filtracija, kojom se pomoću bakterijskih sojeva (*Nitrosomonas, Nitrobacter*) toksični spojevi (amonijak NH_3) nastali oksidacijom produkata metabolizma i nepojedene hrane prevode u manje toksične (nitriti) do potpuno neškodljive spojeve (nitrati); sterilizacija uz pomoć UV svijetla ili ozona; termoregulacija; nadomještanje izgubljenog kisika aeracijom (Timmons i Ebeling, 2010).

1.3. Oksidativni stres

Okidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do neravnoteže između oksidansa i antioksidansa, te posljedično tome do negativnih promjena u strukturi tjelesne stanice. Slobodni radikali i ROS (*reactive oxygen species*) se normalno stvaraju metabolizmom stanica aerobnih organizama, te imaju povoljnu ulogu u biološkim funkcijama stanica, posebice aktivaciju fagocitoze kod neutrofila i makrofaga (Babior, 2000; Dröge, 2003). U prekomjernim koncentracijama reagiraju s biološki važnim molekulama, te modificiraju ili uništavaju DNA, lipide, UH i proteine (Sies, 1985). Izvori ROS mogu biti unutar stanični (oksidacijski enzimi: triptofan dioksigenaza, ksantin oksigenaza-XDH, citokrom P450 reduktaza-NADPH, guanil

ciklaza-GC, glukoza oksidaza-GOx) (Vigo-Pelfrey, 1990), te egzogeni ksenobiotici (kemijski otrovne tvari: prijelazni metali, quinones, bojila, bipyridyl herbicidi, aromatic nitro compounds) (Kappus i Sies, 1981). Ovisno o načinu stvaranja ROS-a, oksidativni stres se dijeli na fotooksidativni stress, metabolički, okolišni, nitrosativni stres, nutricionalni stres (Sies i Jones, 2007). Različiti biomarkeri se koriste u procjeni oksidativnog stresa istraživanih životinja. Jedna od najčešće korištenih metoda u utvrđivanju oksidativnog stresa je TBARS test (*thiobatbituric acid substances test*), kojim se utvrđuju formacije reaktivnog aldehida, malodialdehida (MDA), produkta sekundarne lipidne peroksidacije (Draper i sur., 1993; Janero, 1990). Za dobivanje preciznijih rezultata spomenuta metoda se koristi u kombinaciji s HPLC (*High pressure liquid chromatography*) (Bird i sur., 1983). Oksidativni biomarkeri iz akvatičnih organizama mogu se koristiti u ekološkim monitorinzima (Celso i sur., 2003; Monserrat i sur., 2003). Neki od stresora koji mogu uzrokovati oksidativni stres kod riba uključuju hipoksiju i hiperoksiju (Ritola i sur., 2002a; 2002b), anoksiju-reoksigenaciju (Lushchak i sur., 2001; Ross i sur., 2001), toplinski stres (Parihar i Dubey, 1995; Parihar i sur., 1996), proliferaciju cijanobakterija (Blaha i sur., 2004) i nestašica hrane (Pascual i sur., 2003). Riblje bolesti žutica i methemoglobinemija (*Brown blood disease*) su također povezane sa oksidativnim stresom (Jensen, 1996; Sakai i sur., 1998).

1.4. Imunostimulacija u akvakulturi

Imunostimulansi povećavaju otpornost prema infektivnim bolestima jačanjem nespecifične imunosti za razliku od cijepiva ili baktericina koji aktiviraju produljeni proces stvaranja antitijela tj. specifičnu imunost (Gannam i Schrock, 1999; Sakai, 1999). Bricknell i Dalmo (2005) definirali su imunostimulans kao: "… *prirodan spoj koji modulira imunosni sustav domaćina tako što mu povećava otpornost protiv bolesti koje su u većini slučajeva uzrokovani patogenima*". Imunostimulansi se mogu aplicirati injektiranjem, kupkama ili oralnim putem. U većini istraživanja, učinak imunostimulansa mjerio se otpornošću riba nakon infekcije određenim patogenom, učestalim u uvjetima komercijalnog uzgoja.

1.4.1. Imunosni sustav riba

Evolucija imunosnog sustava akvatičnih organizmima omogućila je razvoj neposredne imunosne reakcije prema neprestanim utjecajima iz vodenog okoliša te odgođene, specifične reakcije koja je kontrolirana razvojem stečenog imunosnog sustava (Gannam i Schrock, 1999). Imunološki sustav riba u osnovi je sličan onom opisanom za sisavce (Sakai, 1999). Retikuloendotelni sustav (RES) riba pruža ranu, nespecifičnu obranu protiv mikrobiološki aktivnih tvari koje ribe okružuju u svim životnim stadijima (Gannam i Schrock, 1999). Staničnu obrambenu funkciju imaju fagocitne stanice slične makrofagima, neutrofilima i *„natural killer“* (NK) stanice, kao i T i B limfocite. U koštunjača, humoralnu obrambenu komponentu čine sustav komplementa (klasični i alternativni putevi aktivacije), lizozomi, prirodni hemolizin, transferin i C-reaktivni protein (CRP) te citokini (interferon, interleukin 2, *makrophage activating factor*) (Sakai, 1999). Granulociti i monociti u krvi te endotelne stanice i makrofagi u tkivima riba aktivni su u obrani od infekcija u škrgama, probavnom sustavu i koži. Bubreg, slezena i jetra glavna su mjesta sinteze endotelnih stanica i makrofaga koji brane organizam riba od patogena koji dospiju u krv (Gannam i Schrock, 1999). Mehanizam djelovanja makrofaga može se kategorizirati kao ovisan ili neovisan o kisiku. Djelovanje ovisno o kisiku posredovano ROS (*reactive oxygen species*) može se utvrditi kemilumiscencijom i NBT (*nitro blue tetrazolium*) testom (Sakai, 1999). U imunologiji, kemijski spoj NBT (oksidans) koristi se za otkrivanje alkalne fosfataze koja, konjugirana na antitijelo, služi kao marker. *Nitro blue tetrazolium* test, dijagnostička je metoda za otkrivanju bakterijskih infekcija i ostalih poremećaja u funkciji fagocita (Freeman i King, 1972). Što su rezultati NBT testa veći, stanica proizvodi više ROS (Nathan i sur,. 1969). Reakcije riba na imunostimulacije obično se povezuju sa nespecifičnim imunosnim sustavom, iako je u nekim slučajevima uočeno povećanje reakcije antigen-antitijelo (Gannam i Schrock, 1999; Sakai, 1999).

1.4.2. Vrste i oralna aplikacija imunostimulansa

Neki od učinkovitih imunostimulansa testiranih na ribama uključuju: sintetičke kemijske agense, bakterijske komponente, polisaharidne ekstrakte iz bakterija, gljiva ili kvasaca, biljaka i

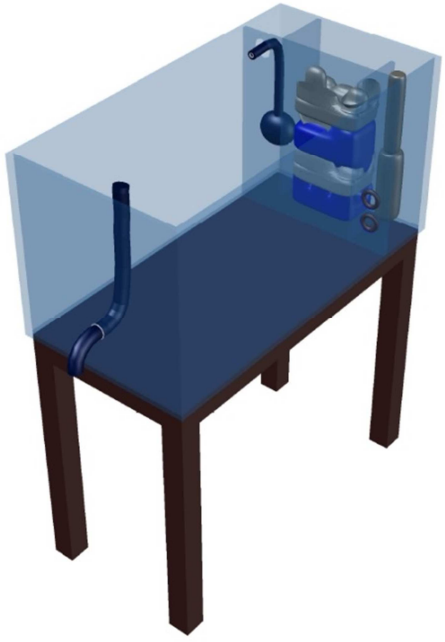
životinja, vitamine, laktoferin, cytokine i prebiotike (Gannam i Schrock, 1999; Sakai 1999). Ove komponente pokazale su se učinkovite u poboljšanju zdravlja, performansama rasta i imunološkom stanju riba. Pozitivni imunomodulirajući efekti zabilježeni su na molekularnoj i staničnoj razini, uključujući aktivaciju makrofaga, povećanu fagocitozu od strane neutrofila i monocita, stimulaciju citotoksičnih T limfocita, lizosoma i protutijela te povećanje serumskih imunoglobulina (Gannam i Schrock, 1999; Sakai, 1999). Naglasak u istraživanjima je stavljan na β-glukane. Raa i sur. (1992) izvijestili su o povećanoj otpornosti atlantskog lososa (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758) prema *Vibrio anguillarum* i *V. salmonicida* nakon oralne aplikacije β-glukana. Kanalski som (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) injektiran s β-glukanom pokazao je povećanu otpornost prema infekciji s *Edwardsiella ictaluri* (Chen i Ainsworth, 1992), međutim oralna primjena nije polučila iste rezultate (Duncan i Klesius, 1996a). Tijekom 35 dana hranidbe formulacijom obogaćenom β-glukanom i oligosaharidima, Yoshida i suradnici (1995) uočili su povećan broj NBT-pozitivnih stanica kod afričkog soma (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822), ali nakon 45. dana isti učinak nije bio prisutan. Nakon oralnog tretmana s glicirizinom, glikozidom gliciretinske kiseline, prirodnim ekstraktom iz slatkog korijena (*Glycyrrhiza glabra*, Linnaeus, 1758) kod žutorepog gofa (*Seriola quinqueradiata*, Temminck&Schlegel, 1845) uočena je povećana otpornost na infekciju s *Enterococcus seriolocida* (Edahiro i sur., 1990; 1991). Povećane aktivnosti fagocitoze, uništavanje bakterija i sinteza superoksida zabilježene su kod kalifornijse pastrve nakon oralne aplikacije sojinog proteina (Rumsey i sur., 1994). Također, upotreba saponina Quil A kroz hranu povećalo je migraciju leukocita kod žutorepog gofa (Ninomiya i sur., 1995). Uporaba imunostimulansa kroz hranidbu može poboljšati otpornost riba prema patogenima tijekom perioda visokog stresa, kao na primjer klasiranje (sortiranje), prebacivanje u more i vakcinacije (Bricknell i Dalmo, 2005).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Riba i pokusni uvjeti

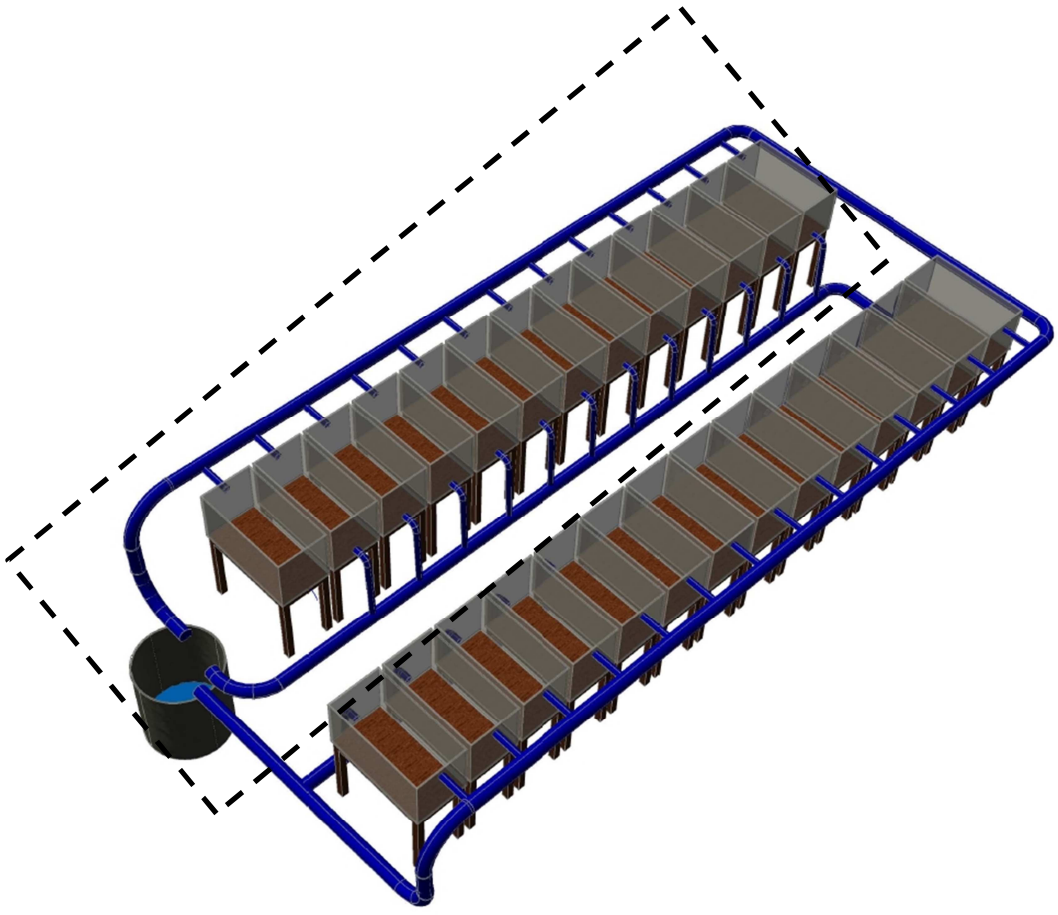
Uzorkovanje klena, *Squalius cephalus* izvršeno je na potoku Kustošak kod Zagrebačke avenije u Zagrebu tijekom mjeseca siječnja. Za uzorkovanje, korišten je ribolovni štap (direktaš 3 m, najlon 0,12 mm, plovak – „kruška“ 3 g, udica *Gamakatsu Specialist* A1 vel. 4, olovna sačma i mamac crv - „škot“), a izlov je obavljen kružakom/podigaćem (četverokutna mreža 1x1 m), radi smanjenja stresa i ozljede riba nastale udicom. Nakon izlova, riba je prebačena u plastičnu bačvu (150 L) koja je služila za transport do laboratorija. Opskrbu riba s kisikom u bačvi osiguravao je *Tetra APS* aerator i tablete “Oxitab“. Zbog uvjeta pokusne sredine koji nisu omogućavali dovoljno dnevne svijetlosti, korištena je umjetna rasvjeta jačine 4 x 18 lux u omjeru 11:13 (svjetlo:mrak). Vodovodna voda se kondicionirala s preparatom *Tetra Pond AquaSafe*.

Adaptacija ribe u laboratorijskim uvjetima trajala je 32 dana, pri čemu je provedena prilagodbu na granuliranu hranidbenu smjesu koja se u pokusu koristila kao kontrola (K) i temperaturu (prosjek 21,13±0,23 °C) vode. U poluotvoreni recirkulacijski sustav (Slika 3) od dvanaest kvadarnih staklenih akvarija (115 L) nasumično je nasađeno 120 klenova (10 riba/akvariju) inicijalne prosječne mase 7,4 g. (Slika 4)..



Slika 3. Akvarij korišten u istraživanju (Autor ilustracije: Marin Kraljev) (AutoDesk, Inc., 2009)

Razinu otopljenog kisika održavali su aeratori (zračne pumpe) *Tetra APS* 400 (230 V) i *Eheim Typ* 3704 010. Stalni protok vode (2,5 L min^{-1}) u akvarijima osiguravale su pumpe za vodu *New-Jet 400* (220-240 V-50 Hz 7W). Biološka filtracija unutar sustava vršila se u posebnoj pregradi unutar akvarija veličine 10 x 18 cm koja je imitirala unutarnji biofilter. Na vrhu pregade nalazila su se sintetička vlakna i pamučna vata koje su služile za mehaničku filtraciju i odstranjivanje krupnijih čestica. Za biološku filtraciju služila su tri sloja akvarijskih biospužvi, između kojih se nalazio sloj poroznih keramičkih cilindara velike dodirne površine. Za aktivaciju biofiltera, odnosno nastanak dušičnih bakterija upotrebljena je hrana u fazi pripreme pokusa. Kvaliteta vode (O_2, pH, oksidoredukcijski potencijal, provodljivost, temperatura) se provjeravala svakih tri dana pomoću uređaja *Hanna Instruments EDGE*. Jednom tjedno izvršena je analitička kemija vode uz pomoć spektrofotometra *HI 83200* kako bi se dobio uvid u alkalinitet, količinu amonijaka, nitrita, nitrata, ugljičnog dioksida i fosfata.



Slika 4. Dio eksperimentalnog recirkulacijskog sustava korištenog u istraživanju (Autor ilustracije: Marin Kraljev) (AutoDesk, Inc., 2009)

2.2. Hranidbeni pokus

Natramune™ (PDS-2865®) je praškasta mješavina hemiceluloze (kompleks polisaharida arabinoksilana i arabinogalaktana) i masnih kiselina dobivenih od biljaka iz porodica *Poaceae* i *Dioscoreaceae* te nekih gljiva. Još sadrži aminokiseline, oligosaharide, glikoproteine i polifenole (Natramune ™). Hranidbena smjesa (K) korištena u istraživanju prilagođena je uzgoju somovskih vrsta s kemijskim sastavom (g/kg): (SP 282,5; SM 45,0; SV 36; Pepeo 77; Vlaga 157; NET 402,5; BE 19,0 MJ kg^{-1}). Veličina granule pokusne hrane iznosila je 2,5 mm. U usporedbi sa nekim standardiziranim veličinama za određenu dobnu kategoriju tj duljinu ribe, pelete su odgovarale najvećim skupinama riba. Pokušaj prilagodbe peleta ribama mlađih kategorija i manjih duljina obavljen je mrvljenjem i specifičnim načinom hranidbe. Fiksacija praška imunostimulansa na hranu obavljena je posipavanjem praha te sprejanjem suncokretovog ulja u koncentracijama od 1% (D1), 3% (D3) i 5% (D5) te sušenju na sobnoj temperaturi 24h (Slika 5). Kontrolna grupa (K) nije tretirana imunostimulansom. Hranidba je vršena u 12 akvarija s tri replikacije kroz 43 dana. Svaki drugi dan pipetirala se nakupljena nepojedena hrana i organski otpad ribe. Hranidba se obavljala ručno, a riba je hranjena jednom dnevno (oko 14:00 h) u količini od 2,5% ukupne tjelesne mase. Vaganje ribe vršeno je na vagi *Kern 440* bez uporabe anestetika. Za potrebe analize rasta, sve ribe su vagane na početku, dvadesettrećeg dana, te na kraju istraživanja kako bi se, uz pomoć uzetih mjera, izračunali proizvodni pokazatelji WG[1], SGR[2], FCR[3] i CF[4] prema referentnim formulama za njihov izračun. Rezultati performansi rasta nisu uzeti u obzir u ovom istraživanju.

[1] WG – Weight gain
[2] SGR – Specific growth rate
[3] FCR – Feed conversion ratio
[4] CF – Condition factor



Slika 5. Pokusne hranidbene smjese (Foto: Pofuk, 2014)

2.3. Mjerenje koncentracije MDA

Na kraju istraživanja, iz svakog hranidbenog tretmana (4) uzorkovano je tkivo dorzalnog mišića riba (12) (n=48). Analize koncentracije malonaldehida u mišićnom tkivu vršene su na Veterinarskom fakutetu. Prije analize, tkiva su homogenizirana u 0,14 M KCl-u, na *Ultra Turrax* homogenizatoru (30 s, 6000 o/min) (Slika 6).



Slika 6. Analize koncentracije malonaldehida u mišićnom tkivu (Foto: Pofuk, 2014.)

10 %-tni homogenati su centrifugirani na 1800 g, 30 min, na 20 °C. Koncentracija ukupnog MDA u 10 %- tnim homogenatima mišića izmjerene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prema modificiranoj metodi (Grotto i sur., 2007) na TSP-130 sustavu (Thermo Separation Products, Inc., Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD). Paralelno s uzorcima, svakodnevno se na jednak način pripremao vanjski standard 1,1,3,3 – tetraetoksipropan, u koncentracijama 0,005, 0,1517, 1,517, 3,035, 15,175 i 30,35 µM te je analizi prethodila kalibracija. U 150 µl svakog uzorka ili standarda dodalo se 50 µl vode i 50 µl natrijeve lužine (3 N). Nakon 30 minuta inkubacije u tresućoj kupelji na 60 °C, dodano je 250 µl 6%-tne fosfatne kiseline i 250 µl 0,8 %-tne tiobarbiturne kiseline, nakon čega se uzorci inkubiraju još 45 minuta u kupelji temperature 90°C. Nakon hlađenja, spoj malondialdehida i tiobarbiturne kiseline se ekstrahiraju dodavanjem 250 µl metanola i 100 µl 10% natrijevog dodecil-sulfata, vorteksiranjem 20 sekundi te centrifugiranjem na 3600 U/min 10 minuta. Pri analizi kromatografijom reverznih faza koristila se Waters symmetry® C18 kolona (Waters, Milford, MA, SAD) duljine 5 cm, promjera 2,1 mm sa česticama punila promjera 3,5 µm. Korištena je pokretna faza od metanola i 50 mM vodene otopine kalijevog dihidrogenfosfata u omjeru 50:50 s dodatkom kalijeve lužine do postizanja pH od 6,8. Protok pokrete faze bio je 0,5

ml/min, vrijeme analize 5 minuta, a valna duljina UV detektora 532 nm. U navedenim uvjetima vrijeme zadržavanja je 3 minute, linearnost metode je 0,99, a pouzdanost 99%.

2.4. Statistička analiza podataka

Pri statističkoj obradi morfometrijskih pokazatelja korištena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) ponavljajućih mjerenja. Podaci koncentracije MDA analizirani su jednosmjernom analizom varijance. Za otkrivanje značajnih razlika između grupa korišten je Fisher's LSD post-hoc test. Rezultati su testirani na razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Fizikalno-kemijski parametri vode i mortaliteti

Prosječni parametri kvalitete vode bili su temperatura 21,13±0,23 °C, otopljeni O_2 9,41±0,97 mg/L, pH 8,17±0,19, NO_3^- 23,13±10,32 mg/L, NO_2^- 0,043±0,02 mg/L, NH_4^+ 0,267±0,13 mg/L. U inicijalnoj fazi istraživanja uočena je pojava ektoparazita *Ichthyophthirius multifiliis* s tipičnim simptomima (trljanje ribe po akvariju, te jedna o drugu, bijele nakupine u obliku zrna soli na tijelu i perajama). Nakon neuspješnog pokušaja liječenja povišenjem temperature vode, riba je tretirana sredstvom protiv parazitarnih (*white spot*) i gljivičnih infekcija riba (*JBL MedoPond*). Tijekom istraživanja uginulo je 53 ribe.

3.2. Marker oksidativnog stresa – malondialdehida (MDA)

Rezultati koncentracije markera oksidativnog stresa, malondialdehida unutar skupina bile su (osim u skupini D1) izrazito varijabilni što se jasno uočava na Slici 7. Prosječne vrijednosti su se kretale od najviših vrijednosti 3,79 ± 2,82 skupine D5 do najnižih 3,02 ± 1,42 skupine D1 (Tablica 1). Jednosmjernom analizom varijance nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji MDA između hranidbenih skupina (Tablica 2).

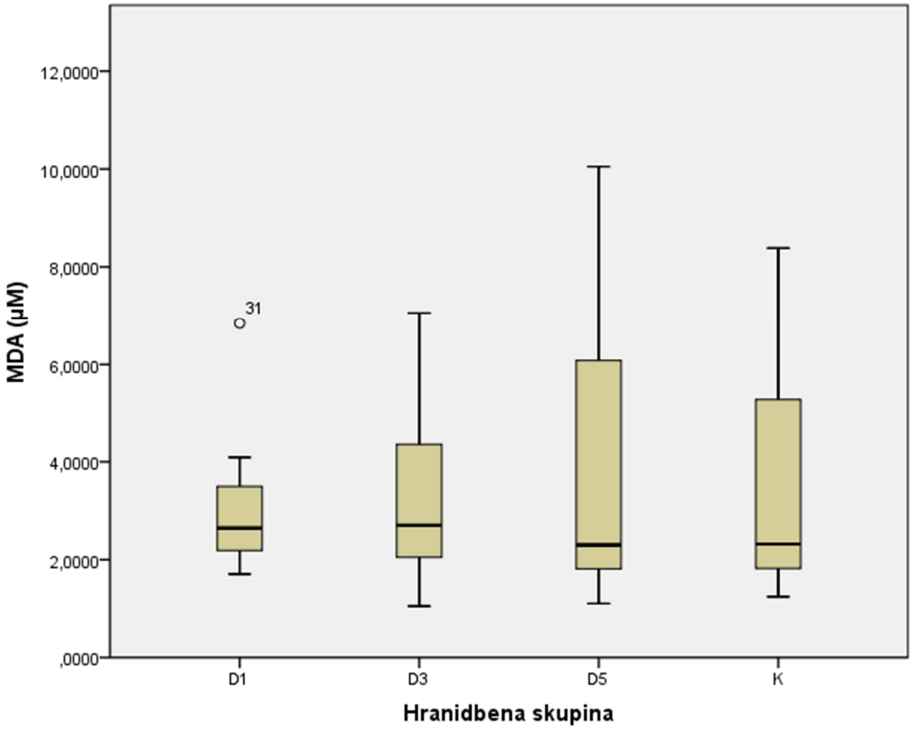
Tablica 1. Rezultati prosječnih vrijednosti koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu riba (μM), (n=48)

Koncentracija / **H. skupina**	**K**	**D1**	**D3**	**D5**
MDA	3,67 ±2,41	3,02 ± 1,42	3,24 ±1,92	3,79 ± 2,82

Tablica 2. Analiza varijance srednjih vrijednosti koncentracije malondialdehida (MDA) u mišičnom tkivu riba između hranidbenih skupina na kraju istraživanja; F (3,43) = 0,319, p=0,812

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata odstupanja (tip III)	Stupnjevi slobode	Srednji kvadrat odstupanja	F	Sig.
Hranidbena skupina	4,623	3	1,541	0,319	0,812
Pogreška	208.031	43	4,838		
Ukupno (korigirano)	212,655	46			

α<0,05



Slika 7. Grafički prikaz rezultata prosječne koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu riba (µM)

4. RASPRAVA

Proizvod Natramune ™ koristi se kao dodatak prehrani kod morskih sisavaca i čovjeka. U nekoliko pilot studija (Chavoustie i sur., 2003; Weeks i Perez, 2009) dokazani su pozitivni učinci na imunosni sustav ljudi. Uočena je povećana sinteza proteinskih hormona citokina i veću aktivnost citotoksičnih T limfocita u uništavanju tumorskih stanica, povećanu aktivnost fagocitoze i cirkulaciju limfocita u krvi (Chavoustie i sur., 2003; Weeks i Perez, 2009). Na temelju tih rezultata, provedena su inicijalna istraživanja na nekoliko vrsta morskih sisavaca (Rodriguez i sur., 2007; Doescher i sur., 2011) sa ograničenim informacijama o rezultatima uspjeha. Potrebna su detaljnija i dugotrajnija istraživanja na drugim vrstama životinja te detaljnije poznavanje sastava i (porijekla/izvora) korištenog imunostimulansa. Jednosmjernom analizom varijance nije utvrđena statistički značajna razlika ($P>0,05$) u koncentraciji MDA (μM) između hranidbenih skupina, s napomenom da je grupa hranjena s najvišom razinom imunostimulansa imala najviše vrijednosti MDA. Ovi rezultati se djelomično slažu s istraživanjima raznih autora o utjecaju prirodnih imonumodulirajućih komponenata na ribama i beskralješnjacima. U osmotjednom istraživanju, Zhou i suradnici (2010) hranili su juvenile sjenke (*Sciaenidae*) *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus, 1766) početne mase 7 g, različitim prebioticima (FOS[5], GOS[6], Bio-MOS®, Previda ™) u razini od 1% suhe tvari hrane kao zamjenu za celulozu. U hranidbenoj smjesi (3 mm promjera), glavni izvori proteina bili su riblje brašno menhadena (*Clupeidae*) i soja, a ulje menhadena kao glavni izvor lipida (41% sirovih bjelančevina, 10% masti). Hranidba se vršila dva puta dnevno, prvotno u količini od 6% te postupno smanjena na 3% tjelesne mase riba. Ribe hranjene s FOS stvarale su značajno ($P<0,05$) manje oksidativnih radikala u krvi nego ostale grupe. Dodavanje prebiotika u hranu značajno ($P<0,05$) je utjecalo na aktivnost serumskih lizosoma u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu (Zhou i sur., 2010). Iako se nisu istraživali isti imunološki parametri kao u provedenom istraživanju, može se pretpostaviti da je na navedene parametre bilo određenog utjecaja. Jedan od mogućih razloga varijabilnih rezultata provedenog istraživanja je hranidba imunostimulansom dozama u postotku tjelesne mase što može rezultirati ne zadovoljavanjem svih riba potrebnim koncentracijama imunostimulansa te izostajanja pozitivnog učinka (Gannam i Schrock, 1999). Također, ovisno o topljivosti, imunostimulansi su različito učinkoviti za pojedine životne stadije

[5] FOS - fructooligosaccharides
[6] GOS - galactooligosaccharides

riba (Gannam i Schrock 1999). Özlüer-Hunt i suradnici (2011) istraživali su utjecaj MOS[7] (2,5; 3,5; 4,5 g MOS/kg hrane) na aktivnost antioksidans enzima kod nilskih tilapija (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) (12 g) kroz 60 dana. Ribe su hranjene dva puta dnevno u količini od 3% ukupne tjelesne mase. Koncentracija MDA (nmol/mg proteina) u jetri značajno se smanjila ($P>0,05$) u svim grupama hranjenih s MOS u odnosu na kontrolnu. Međutim, razina MDA u tkivu nije se statistički razlikovala među skupinama, s time da je grupa hranjena s 4,5 g MOS/kg hrane imala najvišu razinu MDA (Özlüer-Hunt i sur., 2011). Autori su razlike koncentracije MDA među tkivima protumačili različitim stopama stvaranja slobodnih radikala i antioksidans potencijal. Ovi rezultati se popudaraju s provodenim istraživanjem. Utjecaj imunostimulansa ovisi o dozi, metodi i trajanju aplikacije te fiziološkom stanju ribe (Gannam i Schrock 1999; Sakai, 1999). Visoke doze ili duže vremenske aplikacije imaju imunoinhibirajući učinak kod riba (Gannam i Schrock 1999; Sakai, 1999). Dokazano zadržavanje visokih koncentracija imunostimulansa u fecesu riba izaziva nespecifičnu imunosnu reakciju (Gannam i Schrock, 1999). Polisaharidi iz korijena *Panax ginseng* u manjim koncentracijama imaju pozitivne učinke na imunosni sustav kozice *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Liu i sur., 2011). Autori su u 84 dana dugom istraživanju upotrijebili doze od 0,4 g GSP/ kg^{-1} hrane te uočili značajno povećanu aktivnost imunosnih enzima total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) te smanjene razine MDA u škrgama, mišićima i hepatopankreasu u odnosu na kontrolnu skupinu.

U osmotjednom istraživanju utjecaja kompleksa hitosan oligosaharida (75, 150, 300, 600, 1200 mg kg^{-1} hrane) na imunološke parametre juvenila romba (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) ($12,1 \pm 0,1$ g), kojeg su proveli Cui i suradnici (2012), nije utvrđena statistički značajna razlika ($P>0,05$) u koncentraciji MDA u serumu između skupina, iako su ribe hranjene COS-REE[8] imale manje koncentracije nego kontrola. U hranidbenoj smjesi (1,5 x 3,0 mm), riblje brašno je korišteno kao glavni izvor proteina, a riblje ulje i sojin lecitin kao izvori masti. Riba je hranjena dva puta dnevno do prividne sitosti. Rezultati navedenog istraživanja djelomično se slažu s provedenim istraživanjem. Niu i sur. (2013) istraživali su utjecaj hitina i njegovih derivata (hitosana, oligosaharida iz hitosana i N-acetil-d-glukozamina) na aktivnost antioksidans enzima i oksidativni stres kod kozice *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) (inicijalne prosječne

[7] MOS – mannanoligosaccharides

[8] COS-REE – chitosan oligosaccharide complex with rare earth elements

mase 1,49 g) tijekom 70 dana. Ukupni antioksidans status (TAS) i aktivnost enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) kod kozica hranjenih s hitinom, hitosanom i oligosaharidima hitosana bili su viši ($P<0,05$) nego u skupini hranjenoj s N-acetil-d-glukozaminom te kontroli. Koncentracija malondialdehida (MDA) u probavnoj žlijezdi kozica hranjenih s hitinom i hitosanom bila je niža ($P<0,05$) nego u ostalim grupama. Nakon hranidbenog pokusa, kozice su podvrgnute hipoksičnim uvjetima u trajanju od sedam dana. Uočena je povećana ($P<0,05$) aktivnosti glutationa (GSH), TAS, phenoloxidase (PO) i GSH-Px kod kozica hranjenih s hitosanom u odnosu na druge skupine te niže koncentracije MDA u grupi hranjenoj s hitinom i hitosanom nego u ostalim grupama (Niu i sur., 2013). Češnjak (*Allium sativum*) u praškastom obliku ima potencijal smanjiti oksidativni stres (Naeiji i sur., 2013). Istraživao se utjecaj dvije koncentracije (25 i 50 g kg^{-1} hrane) na markere lipidne i proteinske oksidacije u raznim tkivima šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom šest tjedana. Koncentracije MDA u serumu bile su niže u obje tretirane grupe, no značajno niže ($P<0,05$) u grupi šarana hranjenih s 50 g češnjaka/kg^{-1} hrane u odnosu na kontrolnu skupinu. Štoviše, koncentracija češnjaka od 50 g kg^{-1} uzrokovala je značajno niže vrijednosti MDA u jetri i bubrezima, a razina od 25 g kg^{-1} značajno je utjecala samo na koncentracije MDA u jetri (Naeiji i sur., 2013). Rezultati navedenog istraživanja djelomično se slažu s provedenim istraživanjem. Dokazano je da određene imonumodulirajuće komponente brže nestanu iz krvi nego iz jetre i bubrega (Gannam i Schrock, 1999). U šest tjedana dugom istraživanju utjecaja APS[8] (1500 mg/kg hrane), primarne komponente korijena *Astragalus membranaceus*, na imunološki sustav tilapije (42,31±3,14 g), Zahran i suradnici (2014) nisu uočili statistički značajnu razliku u razini MDA u serumu među skupinama. Ostali parametri nespecifičkog imunosnog sustava tijekom istraživanja bili su povećani. Ribe su hranjene komercijalnom smjesom dva puta dnevno *ad libitum*. Rezultati navedenog istraživanja djelomično se slažu s rezultatima provedenog istraživanja. Prirodni izvori imunomodulacije povećavaju apsorpcijsku površinu, te gustoću i dužinu mikrovila u probavilu što dovodi do povećane iskoristivnosti hrane ali i preventivnog djelovanja na infekcije oportunističkih bakterija (Zhou i sur., 2010; Özlüer-Hunt i sur., 2011; Zahran i sur., 2014). Yang i sur. (2014) istraživali su utjecaj fukoidana (ekstrakt iz smeđe alge *Sargassum horneri*, SF i komercijalnog praška fukoidan, MF) u koncentracijama od 0,05%, 0,1% i 0,2%/kg hrane na aktivnost antioksidans

[9] APS – *Astragalus* polysaccharides

enzima i nespecifični imunosni sustav juvenila žutoglavog soma (*Pelteobagrus fulvidraco*, J. Richardson, 1846) tijekom 12 tjedana. Aktivnost enzima superoxide dismutase (SOD) u serumu značajno se povećala, a koncentracija MDA značajno snizila u grupama riba hranjenih s dva izvora fukoidana. Maksimalna aktivnost enzima CAT zabilježena je u grupama s oba dva izvora fukoidana u koncentracijama od 0,1% fukoidana/kg hrane. Aktivnost serumskih lizozoma (LZM) i indeks fagocitoze (PI) kod somova hranjenih s oba izvora fukoidana bili su značajno viši od kontrolne skupine osim skupina SF3, MF2 i MF3. Rezultati istraživanja ukazuju na pozitivni učinak fukoidana prema antioksidans enzimima i nespecifični imunosni sustav žutoglavog soma (Yang i sur., 2014).

Prebiotički kvasac (Grobiotic®-A) pozitivno utječe na imunosni sustav juvenila (15,05±0,04 g) sjeverno pacifičkog iverka (*Platichtahys stellatus*, Pallas, 1787) (Wang i sur., 2014). Istraživan je utjecaj koncentracija od 0,4%, 0,8%, 1,2%, 1,6%, 2,0%/kg hrane tijekom osam tjedana. U odnosu na kontrolnu skupinu, ribe hranjene visokim koncentracijama prebiotika imale su značajno višu aktivnost CAT u serumu i jetri te SOD u serumu. Koncentracije MDA u serumu i jetri značajno su se smanjile u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećavanjem koncentracija prebiotika u hrani, ostali imunološki parametri značajno su odstupali od vrijednosti kontrolne skupine. Koncentracija prebiotika od 1,33%/kg hrane uzrokovala je optimalne performanse antioksidans enzima i imunosnog sustava iverka (Wang i sur., 2014). Gabriel i suradnici (2015) istraživali su utjecaj praška (100%) *Aloe vera* (0,5; 1; 2 i 4%/kg hrane) na aktivnost antioksidans enzima kod juvenila genetični poboljšane uzgojne tilapije (GIFT[9]) (*Oreochromis niloticus*) inficirane *Streptococcus iniae* tijekom osam tjedana. Prije i poslije inficiranja riba s *Streptococcus iniae* ($7,7 \times 10^6$ CFU stanica/mL), uočena je povećana aktivnost enzima SOD, CAT, GSH-Px u grupama riba hranjenim s *Aloe verom* u odnosu s kontrolnom skupinom ($P<0,05$). Iako su rezultati aktvnosti MDA bili varijabilni, statistički značajne razlike ($P>0,05$) nisu uočene između hranidbenih skupina. Koncentracije *Aloe vera* od 1,86; 1,88 i 2.79%/kg hrane pokazale su se optimalne za aktivnost antioksidans enzima kod tilapija (Gabriel i sur., 2015). Sastav hrane, stope hranidbe i konverzije hrane pri različitim temperaturama mogu utjecati na učinkovitost imunostimulansa u hrani kod različitih vrsta riba (Gannam i Schrock 1999; Sakai, 1999).

[10] GIFT – genetically improved farmed tilapia

Istraživajući utjecaj gladovanja na biomarkere stresa kod komarče (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) (86±18 g), Pascual i suradnici (2003) uočili su porast razine MDA nakon trećeg tjedna u grupama riba s djelomičnom i totalnom restrikcijom hrane. Na kraju istraživanja (54 dana) izgladnjivane ribe izgubile su 15% inicijalne težine i hepatosomatski index (HSI) je pao za 26%. Tjedan dana prije kraja pokusa, izgladnjivanim grupama riba uključena je hranidba (2%), te su uvjeti oksidativnog stresa nestali (Pascual i sur., 2003). Varijabilnost rezultata provedenog istraživanja može se djelomično protumačiti ne prihvaćanjem hrane najmanjih kategorija riba. U provedenom istraživanju fiksiranje praška na uljem premazanu granuliranu hranu te specifičnu hranidbu najmanjih kategorija riba uzrokovalo je osipanje hrane. Pri smanjenoj apsorpciji utjecaji imunomodulacije mogu biti umanjeni ili usporeni (Gannam i Schrock, 1999). Ako je imunomodulirajuća tvar u hrani topljiva u vodi, dodatni efekt može imati i izravna izloženost vanjskog sloja kože ribe koja je prva crta obrane protiv patogena (Gannam i Schrock, 1999). Različite komponente u hrani, također mogu utjecati na učinkovitost korištenog imunostimulansa (Gannam i Schrock, 1999), stoga je bitno poznavanje svih komponenata korištene hrane te njihove međusobne interakcije. Tijekom istraživanja, pojava ihtiofirijaze suzbijena je komercijalnim sredstvom. Moguće je da su se rezidualni sastojci akumulirali u tkivima riba te u interakciji sa imunostimulansom unesenim hranom imali imunoinhibirajući učinak. Upotreba nekih imunostimulansa kod riba povećava otpornost prema parazitarnoj bolesti ihtioftirijazi (*white spot disease*) (Sakai, 1999). Učinkovitost obrambenih mehanizama riba mijenja se pri različitim temperaturama, stoga pažnju treba usmjeriti prema sezonskim i okolišnim promjenama (Gannam i Schrock, 1999). S obzirom da su klenovi promjenom okoliša doživjeli promjenu u temperaturi habitata, može se pretpostaviti i određen negativni učinak na njihov imunosni sustav pri početku istraživanja. Također, razni autori utvrdili su visoku osjetljivost klena na stresne manipulativne radnje poput rukovanja, ulova mrežom, transporta te ograničavanja prostora s posljedicom visokog mortaliteta (Witeska i sur., 2015).

5. ZAKLJUČCI

Uporaba recirkulacijskog sustava u pokusu omogućila je kontrolu nad svim važnijim parametrima sredine, te je pri tom olakšala provedbu hranidbenog pokusa. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju da je uključenje imunostimulansa (1%, 3%, 5%) u hranidbu varijabilno utjecalo na koncentraciju malonaldehida u mišićnom tkivu riba. Najniža razina MDA u tkivima uočena je u grupi hranjenoj s 1% (D1). Izloženost stresu, oboljenja u fazi pokusa, loša adaptacija na hranu, te mortaliteti kod riba u pokusu mogući su uzroci visoke varijabilnosti rezultata unutar i između hranidbenih skupina.

6. POPIS LITERATURE

Autodesk, Inc. (2009): AutoCAD 2010. (software for Computer-Aided Design) http://usa.autodesk.com/

Babior, B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine. Vol 109, Issue 1, 33-44

Bird, R.P., Silas, S., Hung, S., Hadley, M., Draper, H.H. (1983) Determination of malondialdehyde in biological materials by high pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. 128, 240-244

Blaha, L., Kopp, R., Šimkova, K. and Mareš, J. (2004) Oxidative Stress Biomarkers are Modulated in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) Exposed to Microcystin-Producing Cyanobacterial Water Bloom. ACTA VET. BRNO 2004, 73: 477-482

Bricknell, I. and Dalmo, R.A. (2005) The use of immunostimulans in fish larval aquaculture. Fish&Shellfish Immunology 19 (2005) 457-472

Caffrey, J.M., Acevedo, S., Gallagher, K. and Britton, R. (2008) Chub (*Leuciscus cephalus*): a new potentially invasive fish species in Ireland. Aquatic Invasions (2008) Volume 3, Issue 2: 201-209

Celso, A., Bainy, D., Marques, M.R.F. (2003) Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. Commun. Toxicol. 9, 271-278

Chavoustie, S., Perez, P., Fletcher, M., Maher, K., Mitrani, A., Thomas, R. (2003). Pilot study: Effect of PDS-2865® on natural killer cell cytotoxicity. Journal on Nutraceuticals and Nutrition 6(2):39-42.

Chen, D and Ainsworth, A. (1992) Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish. Dis. 1992: 15, 295-304

Cui, L., Xu, W., Ai, Q., Wang, D., Mai, K. (2012) Effects of dietary chitosan oligosaccharide complex with rare earth on growth performance and innate immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture Research, 2012, 1–8

Doescher, B.M., Mejia-Fava, J., Colitz, C., Pestano, N., Perez, P. and Pawloski, J. (2011) Treatment of recurrent chronic ulcerative dermatitis in a Bottlenose dolphin (*Tursiops*

truncates). IAAAM 42nd Annual Conference Proceedings, May 2011, Las Vegas, Nevada, Pp. 173-174

Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmooch, H., Wu, J., Agarwal, S., Handley, M. (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radicals Biol. Med. 15, 353-363

Dröge, W. (2003) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47-95

Duncan, P. L. and Klesius, P. H. (1996a) Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Anim. Health 8, 241–248.

Edahiro, T., Hamoguchi, M. and Kusuda, R. (1990) Effect of glycyrrhizine against streptococcal infection of young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Suisanzoshoku 38, 239–243, In Japanese.

Edahiro, T., Hamoguchi, M.and Kusuda, R. (1991) Suppressive effect of glycyrrhizin against streptococcal infection promoted by feeding oxidized lipids to yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Suisanzoshoku 39, 21–27, In Japanese.

Freeman, R. and King B. (1972) Technique for the performance of the *ni*tro-blue tetrazolium (NBT) test. *Journal of Clinical Pathology 25 (10): 912–914.*

Gabriel, N. N., Qiang, J., Ma, X. Y., He, J., Xu, P. and Liu, K. (2015) Dietary *Aloe vera* improves plasma lipid profile, antioxidant, and hepatoprotective enzyme activities in GIFT-tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus iniae* challenge. Fish Physiology and Biochemistry, Volume 41, Issue 5, pp 1321-1332

Gannam, A.L. & Schrock, R.M. (1999) Immunostimulants in Fish Diets. Journal of Applied Aquaculture, Vol. 9(4) 1999

Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J., Garcia, S.C. (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visivle detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Volume 43, Issue 2, pp 619-624

Janero, D.P. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic. Biol. Med. 9, 515-540

Jensen, F. B. (1996). Physiological effects of nitrite in teleosts and crustaceans. In Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular, and Molecular Approaches, Taylor, E. W., Ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 169–186.

Kappus, H. and Sies, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. Experientia, Volume 37, Issue 12, pp 1233-1241

Kottelat, K. and Freyhof, J. (2007) Handbook of European Freshwater Fishes, Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 264 p.

Liu, X-L,, Xi, Q-Y,. Yang, L., Li, H-Y., Jiang, Q-Y., Shu, G., Wang, S-B., Gao, P., Zhu, X-T. And Zhang, Y-L. (2011) The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology Volume 30, Issue 2, Pages 495–500

Lushchak, V.J., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M. (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxigenation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, 100-107

Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., Roque d'Orbcastel, E., Verreth, J.A.J. (2010) New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. Aquacultural Engineering 43 (2010) 83-93

Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A. (2003) Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. Commun. Toxicol. 9, 255-269

Muus, B.J. and Dahlstrom, P. (1999) Freshwater fish. Hedehusene: Gads Forlag

Naeiji, N., Shahsavani, D. And Baghshani, H. (2013) Effect of dietary garlic supplementation on lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers of tissues as well as some serum biochemical parameters in common carp *Cyprinus carpio*. Fisheries Science, Volume 79, Issue 4, pp 699-705

Nathan, D. G., Baehner, R. L. and Weaver, D. K. (1969) Failure of nitro blue tetrazolium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. J. Clin. Invest. 48 (10): 1895–904.

Ninomiya, M., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M., Yamamoto, T. and Kusuda, R. (1995) Enhancement of chemotactic activity of yellowtail *Seriola quinqueradiata* leucocytes by oral administration of quillaja saponin. Fish Shellfish Immunol. 5, 325–328.

Niu, J., Lin, H-Z., Jiang, S-G., Chen, X., Wu, K-C., Liu, Y-J., Wang, S. and Tian, L-X. (2013) Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. Aquaculture, Volumes 372–375, Pages 1–8

Nunn A.D., Cowx I.G., Harvey J.P. (2002) Recruitment patterns for six species of cyprinid fishes in the lower River Trent England. Ecology of Fresh Water Fish 11: 74-84

Özlüer-Hunt, A., Berköz, M., Özkan, F., Yalin, S., Erçen, Z., Erdoğan, E., Gündüz, S.G. (2011) Effect of Mannan Oligosaccharide on Growth, Body Composition, and Antioxidant Enzyme Activity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IIC:63.2011.619, 8

Parihar, M.S., Dubey, A.K. (1995) Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. Comp. Biochem. Physiol. C 112, 309-313

Parihar, M.S., Dubey, A.K., Tarangini, J. and Prakash, P. (1996). Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipids content in liver of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. J. Therm. Biol., 21, 323–330.

Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J. and Peinado, J. (2003) Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish *(Sparus aurata*). Chemico-biological Interactions 145 (2003), 191-199

Raa, R., Rørstad, G., Engstad, R.and Robertsen, B. (1992) The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. Eds. , Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 39–50.

Ritola, O., Peters, L.D., Livingstone, D.R. and Lindstrom, S.P. (2002a). Effects of in vitro exposure to ozone and/or hypoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione, and lipid peroxidation in red blood cells and plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult. Res., 33, 165–175.

Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Lindstrom, S.P. (2002b) Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. Aquaculture, 210: 1–19

Rodriguez, M. M., Mejia, J.C., Blanchard, M.T., Stott, J., Pestano, N., Perez, P.P. (2007). Pilot Study: The Affects of NatramuneTM (PDS-2865®), a New immunostimulator supplement on different cetacean species; *Tursiops truncatus*, *Lagenorhynchus obliquidens*, and *Orcinus orca*. IAAAM 38th Annual Conference Proceedings, Orlando, FL; Pp. 44-45.

Ross, S.W., Dalton, D.A., Kramer, S. and Christensen, B.L. (2001). Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. Comp. Biochem. Physiol., 130C, 289–303.

Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P.and Bowser, P.R. (1994) Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 323–339.

Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunosimulans. Aquaculture 172 (1999) 63-92

Sakai, T., Murata, H., Endo, M, Shimomura, T., Yamauchi, K., Ito, T., Yamaguchi, T., Nakajima, H and Fukudome, M. (1998). Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture, 160, 205–214.

Sies, H. (1985) Oxidative stress, Introductory remarks, In: Oxidative Stress (H. Sies, ed.) Academic Press, London

Sies, H. and Jones, D. (2007) Oxidative Stress. in Encyclopedia of Stress, 2nd edn. San Diego: Elsevier, 2007; 45-48

Spillman, C-J (1961) Faune de France: Poissons d'eau douce. Fédération Française des Sociétés Naturelles,Tome 65. Paris. 303 p.

Timmons, M.B. and Ebeling, J.M. (2010) Recirculating aquaculture. NRAC Publications No. 401-2010

Vigo-Pelfrey, C. (Ed.), 1990. Membrane Lipid Oxidation, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL.

Wang, J., Zhang, D., Sun, Y., Wang, S., Li, P., Gatlin, D. M. and Zhang, L. (2014) Effect of a dairy-yeast prebiotic (GroBiotic®-A) on growth performance, body composition, antioxidant capacity and immune functions of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). Aquaculture Research, Article first published online: 18 JUL 2014 DOI: 10.1111/are.12501

Weeks, B.S., and Perez, P.P. (2009) The hemicellulose preparation, Natramune (PDS-2865) , increases macrophage phagocytosis and nitric oxide production and increases circulating human lymphocytes levels. Med Sci Monit, 2009; 15(2): 43-46

Witeska, M., Kondera, E., Lugowska, K., Dmowska, A. (2015) Hematological effects of crowding stress in European chub Leuciscus cephalus L. and common carp Cyprinus carpio L. ISSN 1392-2130. VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA (Vet Med Zoot). T. 70 (92). 2015

Yang, Q., Yang, R., Li, M., Zhou, Q., Liang, X. And Elmada, Z. C. (2014) Effects of dietary fucoidan on the blood constituents, anti-oxidation and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish & Shellfish Immunology, Volume 41, Issue 2, Pages 264–270

Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V. (1995) Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. J. Fish Dis. 18, 195–198.

Zahran, E., Risha, E., AbdelHamid, F., Mahgoub, H.A., Ibrahim, T. (2014) Effects of dietary Astragalus polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish&Shellfish Immunology xxx (2014) 1-9. Article in press

Zhou Qui-Cun, Alejandro Buentello, J., Delbert M. Gatlin III (2010) Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 309 (2010) 253-257

7, PRILOZI

Tablica 3. Fisher's LSD: Post hoc analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu riba između hranidbenih skupina na kraju istraživanja

(I) hr. skupina	(J) hr. skupina	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
D1	D3	-,216425	,8979548	,811	-2,027323	1,594473
	D5	-,769367	,8979548	,396	-2,580265	1,041532
	K	-,645325	,9181361	,486	-2,496923	1,206273
D3	D1	,216425	,8979548	,811	-1,594473	2,027323
	D5	-,552942	,8979548	,541	-2,363840	1,257957
	K	-,428900	,9181361	,643	-2,280498	1,422698
D5	D1	,769367	,8979548	,396	-1,041532	2,580265
	D3	,552942	,8979548	,541	-1,257957	2,363840
	K	,124042	,9181361	,893	-1,727556	1,975640
K	D1	,645325	,9181361	,486	-1,206273	2,496923
	D3	,428900	,9181361	,643	-1,422698	2,280498
	D5	-,124042	,9181361	,893	-1,975640	1,727556

8. ŽIVOTOPIS AUTORA

Matija Pofuk

Rođen u Zagrebu, 20.01.1986. Srednju, Upravnu i birotehničku školu, smjer poslovni tajnik, završio sam u Zagrebu. Fakultetsko obrazovanje započeo sam 2009. godine na preddiplomskom studiju "Animalne znanosti", Agronomskog fakulteta. Od samog početka studija aktivan sam na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju. Sudjelovao sam na mnogim nastavnim i izvannastavnim aktivnostima te terenskim istraživanjima i projektima koji su doprinijeli znanstvenoj zajednici i popularizaciji znanosti među mladim ljudima. Sudjelovao sam u provedbi istraživanja vezanog za praćenje pčela skupljačica na paši lavande što je rezultiralo izradom znanstveno-stručnog rada pod naslovom „Skupljačka aktivnost sive pčele (*Apis mellifera carnica* Poll., 1879) i melisopalinološka analiza sadržaja mednog mjehura i peludnog tereta na paši lavande (*Lavandula* spp.)". Spomenuti je rad 2013. godine nagrađen Dekanovom nagradom. U akademskoj godini 2014./2015. odabran sam za izvođenje aktivnosti u funkciji demonstratora na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalna zoologija na modulima lovačke i ribarske skupine. Uz navedeno, sudjelovao sam u pripremi i provedbi istraživanja vezanog za utjecaj imunostimulansa u hrani na klena što je rezultiralo izradom znanstveno-stručnog rada pod naslovom „Utjecaj imunostimulansa IMUNO-2865 na performanse rasta i oksidacijski stres klena (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758). Rad je prihvaćen za objavu na 51. hrvatskom i 11. međunarodnom simpoziju agronoma koji će se održati u Opatiji od 15. - 18. veljače 2016. godine. Spomenuti je rad, također, nagrađen Dekanovom nagradom 2015. godine.

Kontakt e-mail : pofukmat@gmail.com