

# Imunomodulacijski učinak plemenite pečurke *Agaricus bisporus* u tovnih pilića

G. Mršić, D. Špoljarić, H. Valpotić, Mirta Balenović, Lidija Kozračinski, I. Špoljarić, I. Valpotić, V. Savić, S. Srećec i Maja Popović



## Uvod

Genetski i paragenetski činitelji, uključujući pasminu, način držanja i uzgoja, hranidbu, mikrookoliš, učestalost izlaganja uzročnicima bolesti, kao i programima specifične i nespecifične imunomodulacije utječu na zdravlje i proizvodnost domaćih životinja u intenzivnom uzgoju. Napose hranidba ima vrlo značajnu ulogu u modulaciji primljivosti domaćih životinja prema infekcijskim bolestima. Interakcija između hranidbe i infekcijskih bolesti je dvojaka. Hranidbene potrebe mogu biti znatno promijenjene zbog prisutnosti kliničke pa i nekliničke bolesti, a hranidbeni status može utjecati na imunokompetenciju, a posljedično tomu i na otpornost domaćih životinja prema uzročnicima bolesti (Grimble, 2001.). Imunosni sustav domaćih životinja nije autonoman, već je pod stalnim utjecajem ostalih fizioloških sustava, ali i pod utjecajem velikog broja okolišnih činitelja pa tako i uobičajenih sastojaka hrane i dodataka hrani, odnosno nutrijenata i nutraceutika (Valpotić, 2009.). Shodno tomu nutritivni i imunosni status domaćih životinja

namijenjenih prehrani ljudi, uzgajanih u intenzivnoj proizvodnji, izravno ovise o recepturi hrane koja mora poticati rast i održavati zdravlje, a ujedno biti i gospodarski opravdana. Takvi obroci, osim što moraju zadovoljiti nutritivne potrebe ovisno o vrsti životinje, i o uzgojnoj kategoriji, moraju biti i djelotvorni u moduliranju selekcije vrsta/sojeva crijevnih mikrobiota, s time da djeluju stabilizirajuće na komezalne mikroorganizme, a moraju stimulacijski djelovati i na sastavnice imunosnog sustava i time pojačavati otpornost organizma na infekcijske bolesti. Danas kada se napušta neklinička uporaba antibiotskih poticatelja rasta (APR) u intenzivnom uzgoju domaćih životinja namijenjenih prehrani ljudi, intenzivno se istražuju alternativne tvari (probiotici, prebiotici i imunomodulatori) kao dodatci hrani koji bi trebali nadomjestiti APR (Gallois i sur., 2009.). U području biomedicine, posebno u imunoprofilaksi/imunoterapiji infekcijskih bolesti i u terapiji tumorskih bolesti, raste interes za tvarima, prije svega za polisaharidima  $\beta$ -glukanima,

Gordan MRŠIĆ, dipl. ing. biotehnologije, asistent, Sveučilišni studijski centar za forenzične znanosti Sveučilišta u Splitu; Daniel SPOLJARIĆ, asistent, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Ivica VALPOTIĆ, dipl. biol., redoviti profesor, dr. sc. Lidija KOZRAČINSKI, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet. redovita profesorica, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Mirta BALENOVIĆ, viša asistentica-znanstvena novakinja, dr. sc. Vladimir SAVIĆ, viši znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut; Zagreb; Igor ŠPOLJARIĆ, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zagreb; dr. sc. Siniša SREĆEC, dipl. biol., redoviti profesor, Visoko gospodarsko učilište, Križevci

iz različitih vrsta gljiva (napose iz šitaka i maitaka) kojima se pripisuju ljekoviti učinci za koje tradicijska kineska medicina zna već od davnina (Aida i sur., 2009.). Poznato je da gljive sadrže brojne biološki djelatne tvari (kao što su: glukani, manani, lentinani, grifolani, šizofilani, skleroglukani) nedvojnog antibakterijskog, antivirusnog, antitumorskog te imunostimulacijskog učinka pa su stoga zanimljive za humanu medicinu, napose za onkologiju (Borchers i sur., 2004.). Smatra se da su ti učinci djelatnih iscrpaka gljiva u terapiji tumora najvjerojatnije neizravni, i da se očituju kroz učestalija prikazivanja antigena posredstvom dendritičkih stanica, a da potom na tumorske stanice izravno djeluju senzibilizirani citolitički T limfociti (Borchers i sur., 2008.). Njihova ljekovita svojstva očituju se i učincima na snižavanje koncentracije kolesterola, reguliranje krvnog tlaka, reguliranje razine šećera u krvi, reguliranje probave, poboljšavanje rada dišnih organa te stimuliranje ili smirivanje središnjeg živčanog sustava na modelu štakora (Jeong i sur., 2010.). Najtemeljitije istraživani sastojci gljiva s takvim djelovanjem su: glukani, polisahardne makromolekule iz njihove stanične stijenke, koji imaju i protutumorski učinak (Fortes i sur., 2006.). Protuupalni učinak iscrpka plemenite pečurke dokazan je u *in vitro* i *in vivo* uvjetima pokusno izazvane upalne reakcije na mišjem modelu, temeljem regulacije aktivnosti makrofaga te pojačavanja izlučivanja TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  i snižavanja izlučivanja IL-10 (Yu i sur., 2009.). Međutim, gljive su i izvor velikog broja antioksidansa, vitamina A, C, D i E te minerala poput fosfora, kalija i željeza te stoga imaju i značajno nutritivno djelovanje.

Gljiva plemenita pečurka *Agaricus bisporus*, poznatija kao šampinjon, jedna je od najčešće uzgajanih vrsta gljiva u svijetu i sadrži 5,52% suhe tvari u

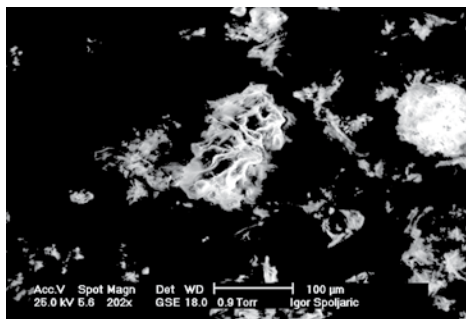
kojoj se nalazi 59,44% proteina, 31,51% ugljikohidrata i 6,32% pepela (Novak, 1997.). Dobre nutritivne karakteristike plemenite pečurke, s niskim udjelom masnoća i visokim udjelom proteina te ugljikohidrata, među kojima su najzastupljenija dijetalna vlakna, čine ih vrlo prihvatljivom namirnicom ne samo za čovjeka, već i za domaće životinje namijenjene ljudskoj prehrani, kao što su svinje i perad. Međutim,  $\beta$ -glukani izdvojeni iz micelija plemenite pečurke i njezinih srodnika (*A. blazei*, *A. sylvaticus*) imaju, osim protutumorskog djelovanja u laboratorijskih glodavaca i imunostimulacijski učinak na sustavnu i lokalnu (crijevnu) imunost nekih vrsta farmskih životinja (Barbisan i sur., 2002., Brown i Gordon, 2003., Shen i sur., 2007.). Tako je, primjerice utvrđeno da pripravak osušene plemenite pečurke djeluje povoljno na crijevnu histomorfologiju i populaciju komenzalnih mikrobiota u tovnih pilića (Giannenas i sur., 2010.a), kao i na proizvodne pokazatelje i antioksidativni status njihova mesa (Giannenas i sur., 2010.b). Slijedom ovih podataka istraživali smo učinak osušenog pripravka plemenite pečurke *A. bisporus* dodanog u hrani tovnim pilićima na njihov stanični imunostatus tijekom uzgojnog razdoblja od 38 dana u pokusnim uvjetima. Praćenjem promjena u udjelu CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica periferne krvi nastojali smo utvrditi imunomodulacijski učinak pripravka i temeljem kinetike nespecifičnog staničnog imunostatusa odgovora procijeniti njegovo značenje u uspostavljanju zaštitne sustavne imunosti u tovnih pilića.

## Materijali i metode

### Pripravak plemenite pečurke

U istraživanjima smo uporabili svježu biomasu plemenite pečurke *A. bisporus* iz komercijalnog uzgoja. Svježe, netom

ubrane plemenite pečurke sušene su u sušari na 42 °C kroz 6 sati, a potom su bile samljevene u prah. (Slika 1). Prah smo umiješali u standardnu komercijalnu hranu za piliće u tovu (Pipo d.o.o., Čakovec, Hrvatska) u koncentracijama od 10 g/kg i 20 g/kg.



**Slika 1.** Čestice praha nativnog pripravka osušene biomase plemenite pečurke prikazane elektronskim mikroskopom XL30 ESEM TUNGSTEN, Philips, Nizozemska

### Tovni pilići

Za istraživanje smo uporabili 90 jednodnevnih pilića (45 mušskog i 45 ženskog spola) namijenjenih tovu (soja ROSS 308)) podrijetlom iz komercijalnog matičnog jata tvrtke PIPO d.o.o. iz Čakovca. Piliće smo držali kroz 38 dana u pokusnim prostorijama Zavoda za prehranu i dijetetiku domaćih životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Raspodjelili smo ih u 3 pokusne skupine (K = kontrola; D1 i D2) s po 30 pilića (15 ženskog i 15 mušskog spola) u svakoj. Skupine smo držali u odvojenim kavezima na dubokoj stelji u skladu s tehnološkim uvjetima intenzivnog uzgoja.

### Plan pokusa

Piliće iz kontrolne skupine hranili smo standardnom hranom namijenjenom za tov pilića, i to: od 1. do 14. dana života starterom, od 14. do 28. dana života finišeom I, a od 28. do 38. dana finišeom II. Pilićima iz skupina D1 i D2 dodavali smo u hranu za tov pilića praškasti pripravak plemenite pečurke u

koncentracijama od 10 g/kg (skupina D1) ili 20 g/kg (skupina D2) tijekom cijelog pokusnog razdoblja. Tijekom pokusa su pilićima hrana i voda bili dostupni *ad libitum*. Pri izvođenju pokusa s pilićima smo postupali u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (Narodne novine 135/06.).

### Protočna citometrija

Protočnim citometrom Coulter EPICS-XL kvantificirali smo udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica u perifernoj krvi pilića u tovu kao što smo već ranije opisali (Popović i sur., 2007.). Uzorke periferne krvi (1,5 mL) uzimali smo u staklene epruvete s podtlakom (Beckton Dickinson, Plymouth, Velika Britanija) i EDTA (Sigma) antikoagulansom, i to 0. dana iz srca, a 14., 28. i 38. dana pokusa iz krilne vene pileta. Prilikom svakog uzimanja krvi iz svake smo skupine nasumično uzimali krv od po 7 životinja. Uzorke krvi (100 µL) razrijedili smo u 1 x PBS radnoj otopini do broja leukocita od 5,0 – 9,7 x 10<sup>9</sup>/L. Potom smo u 100 µL razrijeđene krvi dodali 50 µL monoklonskog protutijela protiv kokošjeg CD45<sup>+</sup> antigena obilježenog FITC-om (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, SAD) te kroz 20 minuta inkubirali na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji uzorke smo isprali s 1 mL 1x PBS-a i centrifugirali kroz 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Nadtalog smo odlili, a na talog dodali 0,5 mL lizirajućeg amonijevovog kloridnog pufera (NH<sub>4</sub>Cl; pH 7,3) da djeluje u mraku kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom smo uzorke isprali s 1 mL 1x PBS-a centrifugiranjem kroz 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Po odljevanju nadtaloga na talog smo dodali 1 mL 1x PBS pufera te smo tako pripremljeni uzorak citometrijski analizirali. Sve smo uzorke pripremili u triplicatu i analizirali po 10 000 stanica u svakom.

### Statistika

Statističku smo opravdanost razlika u udjelu CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica između

**Tabela 1.** Udjeli CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica u perifernoj krvi pilića u tovu hranjenih uz dodatak 10 g/kg (skupina D1) ili 20 g/kg (skupina D2) praškastog pripravka plemenite pečurke (*A. bisporus*) tijekom 38 dana pokusa.

Statistički pokazatelj	Udjeli CD45 <sup>+</sup> limfoidnih stanica (%) u perifernoj krvi pilića u tovu po danima hranjenja (N=7)											
	K			D1			D2			D1 vs. D2 (df=6)		
Tretiranja	0	14	28	38	0	14	28	38	0	14	28	38
<b>Dani hranjenja</b>	0	14	28	38	0	14	28	38	0	14	28	38
Sred. vr.	50,45	55,9	57,93	61,01	50,61	63,77	72,71	72,96	50,45	59,63	68,14	72,07
St. Dev.	1,34	1,22	0,49	0,62	0,79	0,48	0,55	0,57	1,34	0,43	3,52	0,41
Var.	1,81	1,51	0,24	0,39	0,63	0,23	0,30	0,33	1,81	0,19	12,43	0,17
Coef. Var.	2,67	2,19	0,84	1,03	1,57	0,75	0,75	0,78	2,66	0,73	5,17	0,57
Stand. pogreška	0,508	0,464	0,185	0,236	0,30	0,15	0,20	0,21	0,51	0,16	1,33	0,15
<b>Usporedbe</b>	<b>D1 vs. K</b> (df=6)			<b>D2 vs. K</b> (df=6)			<b>D1 vs. D2</b> (df=6)					
<b>Dani hranjenja</b>	0	14	28	38	0	14	28	38	0	14	28	38
<b>Razlike</b>	0,16	7,87	14,77	11,95	0,00	3,73	10,21	11,06	0,16	4,13	4,56	0,89
Stand. Dev. Diff.	1,01	1,37	0,77	0,78	-	1,37	0,77	0,60	1,01	0,60	3,57	0,57
t	0,42	15,09	50,54	40,24	-	15,09	50,54	40,24	0,41	17,98	3,38	4,09
p	0,69	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	0,69	<0,001	0,014	0,006

triju skupina pilića u tova (K, D1 i D2), po danima uzimanja uzoraka krvi (0., 14., 28. i 38. dana pokusa) proveli *t*-testom za vezane uzorke. Vezu smo između broja dana hranjenja i promjene prosječnog udjela CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica u tri skupine pilića ustanovili Spearmanovim koeficijentom rangova ( $r_s$ ). Statističku smo analizu podataka proveli uporabom programskog paketa STATISTICA 8.0.

## Rezultati

Tijekom 38 dana pokusa, prosječni udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica povećava se u sve tri skupine. Međutim, iako vrijednosti Spearmanovog koeficijenta rangova, u sve tri skupine, pokazuju potpunu korelaciju između broja dana hranjenja i udjela CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica ( $r_s = [0,97-1]$ ), vjerojatnost pogriješke veća je od 0,05, čime se povećanje prosječnog udjela CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica ovisno o broju dana hranjenja životinja smatra nesigificantnim. (Tabela 1).

Međutim, *t*-testom smo utvrdili statistički značajno veće razlike u prosječnom udjelu CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica između D1 i D2 skupine pilića i kontrole, naravno osim za 0. dan života. Skupine D1 i D2 imale su statistički značajno veći udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica ( $p < 0,001$ ) 14., 28. i 38. dana pokusa u usporedbi s kontrolom. Tako smo već 14. dana pokusa u skupinama pilića hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke zabilježili od 6% (skupina D2) do 13% (skupina D1) veći udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica. Također, usporedbom razlika u udjelu CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica između D1 i D2 skupine, taj je udjel razvidno veći 14. (za 5,6%), 28. (za 6,3%) i 38. (za 2,2%) dana pokusa u D1 skupini. Sve su dobivene vrijednosti bile statistički značajno veće, s donjom granicom signifikantnosti od  $p = 0,05$ . (Tabela 1).

## Rasprava

S obzirom da u dostupnoj literaturi nema podataka o učinku iscrpka plemenite pečurke na kinetiku promjena udjela CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica periferne krvi pilića u tovu, nismo mogli uspoređivati naše podatke niti u potpunosti vrjednovati objektivno značenje ovih, inače indikativnih rezultata koji govore u prilog imunostimulacijskom djelovanju pripravka plemenite pečurke dodanog u hrani. Međutim, ovaj bi se porast ukupnih limfoidnih stanica u perifernoj krvi tovnih pilića mogao objasniti poznatim mehanizmom djelovanja gljive *A. blazei* na pojačavanje APC-aktivnosti dendritičkih stanica (Borchers i sur., 2008.), što pak rezultira poticanjem Th1 ili Th2 odgovora posredstvom antigenima senzibiliziranim CD4<sup>+</sup> i/ili CD8<sup>+</sup> T stanicama. Nadalje, dobiveni rezultati mogu poslužiti kao model za nespecifičnu imunoprofilaksu u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji uporabom tvari, poput pripravka plemenite pečurke, koje imaju osobitosti i nutraceutika i imunomodulatora, a ti bi rezultati mogli biti značajni i u širem kontekstu preventivne veterinarske medicine i animalne proizvodnje.

Podatak o udjelu CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica u pilića iz kontrolne skupine bio je u suglasju s našim rezultatima dobivenima za kontrolne skupine u pokusima s kopunima slične dobi (Popović i sur., 2008.), kao i s tovnim pilićima cijepljenim živim ili mrtvim, odnosno živim ili inaktiviranim cjepivom protiv Newcastleleske bolesti (Balenić i sur., 2010., Popović i sur., 2010.). Međutim, nismo našli podatak o učinku pripravka plemenite pečurke na staničnu imunost u tovnih pilića pa stoga smatramo da je utvrđeni imunostimulacijski učinak pripravka na udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica periferne krvi tovnih pilića prvi takav podatak u nas, i vjerojatno jedan od prvih podataka te vrste u svijetu. Daljnja

istraživanja trebala bi potvrditi ili opovrgnuti relevantnost naših podataka, a za sada je utvrđeni učinak pripravka indikativan pokazatelj opravdanosti umješavanja gljiva, a time i njihovih djelatnih tvari  $\beta$ -glukana, u krmne smjese bez APR koje će u bliskoj budućnosti biti u uporabi u intenzivnom uzgoju tovnih pilića.

Ipak, ne nedostaju podatci sličnih istraživanja koji podupiru tezu naših istraživanja o imunosnoj i nutritivnoj modulaciji s pomoću prirodnih tvari, potencijalnih alternativa APR, kao što su gljive, biljke i njihove bioaktivne molekule (posebice  $\beta$ -glukani, flavonoidi, polifenoli, saponini) u intenzivnoj peradarskoj (Ferket, 2004., Kidd, 2004.) i svinjogojskoj proizvodnji (Gallois i sur., 2009.). Tako su brojni autori uporabili bioaktivne polisaharide iz gljiva i biljaka ili pripravke osušene plemenite pečurke kao dodatke hrani pilićima u tovu i utvrdili njihov blagotvorni učinke na zdravstvene i proizvodne pokazatelje te na funkciju crijeva, sastav populacija crijevnih mikrobiota i antioksidativni status (Guo i sur., 2003., Willis i sur., 2007., Giannenas i sur., 2010.a, b, Wallace i sur., 2010.). Posebice je zanimljiv nalaz Willisa i sur. (2007.) koji pokazuje da iscrpak šitake gljiva (*Lentinus edodes*) u kombinaciji s probiotikom (PrimaLac) umanjuje rast tovnih pilića muškoga spola, a potiče rast tovnih pilića ženskoga spola, dok u jedinki obaju spolova povoljno utječe na populaciju komenzalnih mikrobiota. Naprotiv, Giannenas i sur. (2010.b) su utvrdili da pripravak osušene plemenite pečurke djeluje poticajno na rast tovnih pilića bez obzira na spol, i da povećava razinu glutacione peroksidaze, a smanjuje razine glutacione reduktaze u jetri i mesu te time proizvodni zaštitni antioksidativni učinak u tim tkivima. Taj se antioksidacijski učinak plemenite pečurke može protumačiti visokim sadržajem polifenolnih spojeva,  $\alpha$ - i  $\beta$ -tokoferola, karotenoida,

askorbinske kiseline te ergotioneina u micelijima divljih i uzgojenih jestivih gljiva (Dubost, 2007., Elmastas, 2007.). Međutim, oskudni su podatci o učincima plemenite pečurke ili njenih iscrpaka, napose  $\beta$ -glukana, na imunosni sustav tovnih pilića. Naime, istraživanja imunomodulacijskog učinka pripravaka plemenite pečurke uglavnom su provedena na laboratorijskim glodavcima (Chang i Buswell, 1996.), ali i na vrstama beskralješnjaka i kralješnjaka (ribama i domaćim sisavcima), uključujući čovjeka (Akramiene i sur., 2007., Soltanian i sur., 2009.). Glavnina istraživanja provedena je u *in vitro* uvjetima pa je tako iscrpak plemenite pečurke poticao makrofage štakora, odnosno miša na izlučivanje  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$ , a koći izlučivanje IL-10, signalnih i komunikacijskih molekula čija razina određuje smjer i ishod imunosnog odgovora, odnosno upalnog procesa (Chang i Buswell, 1996., Yu i sur., 2009.). Prema dosadašnjim istraživanjima imunomodulacijski se učinci gljiva mogu ponajprije pripisati polisahardnim molekulama  $\beta$ -glukana i  $\alpha$ -manana, a manje drugim polisaharidima i lektinima, premda je utvrđeno da 100 g plemenite pečurke sadrži samo oko 0,2%  $\beta$ -glukana (Brown i Gordon, 2003., Aida i sur., 2009.). Stoga ne čudi činjenica da iscrpak plemenite pečurke ima jače imunomodulacijsko djelovanje od djelovanja njegovih pojedinih molekularnih sastavnica (Guo i sur., 2003., Yu i sur., 2009.). Mehanizmi djelovanja bioaktivnih molekula gljiva donekle su poznati, a temelje se na vezanju  $\alpha$ -manana za manozu na membrani limfoidnih i mijeloidnih stanica (Tzianabos, 2000.), dok se  $\beta$ -D-glukani vežu za receptore na površini makrofaga, neutrofila, NK-stanica, T-limfocita, dendritičkih stanica, fibroblasta i endotelnih stanica i mijenjanju njihove imunosne i metaboličke aktivnosti (Brown i Gordon, 2003., Herre i sur., 2004.). Zanimljiv je i



na udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica periferne krvi tovnih pilića. Naime, tovnici pilići koji su bili hranjeni s dodatkom istraživanih koncentracija pripravka plemenite pečurke imali su znatno veći udjel CD45<sup>+</sup> limfoidnih stanica ( $p < 0,001$ ) u perifernoj krvi 14., 28. i 38. dana pokusa u usporedbi s kontrolom. Utvrđeni imunostimulacijski učinak pripravka indikativan je pokazatelj opravdanosti umješavanja gljiva, a time i njihovih djelatnih tvari  $\beta$ -glukana, u krmne mješave bez APR koje će u bliskoj budućnosti biti u uporabi u intenzivnom uzgoju tovnih pilića.

## Literatura

1. AIDA, F. M. N. A., M. SHUHAIMI, M. YAZID and A. G. MAARUF (2009): Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Tech.* 20, 567-575.
2. AKRAMIENE, D., A. KONDROTAS, J. DIDZIAPETRIENE and E. KEVELAITIS (2007): Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43, 597-606.
3. BALENOVIĆ, M., M. POPOVIĆ, V. SAVIĆ, A. EKERT KABALIN, V. ZECHNER-KRPAN and I. VALPOTIĆ (2010): Kinetikbestimmung von Lymphozyten bei Mastkücken, nach Immunisierung mit Lebend- und Totimpfstoffen gegen die Newcastle Disease. *Tierärztl. Umsch.* 63, 30-37.
4. BARBISAN, L. F., M. MIYAMOTO, C. SCOLASTICI, D. M. F. SALVADORI, L. R. RIBEIRO and A. F. EIRA (2002): Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J. Ethnopharmacol.* 83, 25-32.
5. BARROS, L., T. CRUZ, P. BAPTISTA, L. M. ESTEVINHO and I. C. FERREIRA (2008): Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2742-2747.
6. BORCHERS, A. T., C. L. KEEN and M. E. GERSHWIN (2004): Mushrooms, tumors and immunity: An update. *Exp. Biol. Med.* 229, 393-406.
7. BORCHERS, A. T., A. KRISHNAMURTHY, C. L. KEEN, F. J. MEYERS and M. E. GERSHWIN (2008): The immunobiology of mushroom. *Exp. Biol. Med.* 233, 259-276.
8. BROWN, G. D. and S. GORDON (2003): Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.
9. CHANG, S. T. and J. A. BUSWELL (1996): Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 473-476.
10. DUBOST, N. J. (2007): Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* 105, 727-735.
11. ELMASTAS, M. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Compos. Anal.* 20, 337-345.
12. FERKET, P. R. (2004): Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. In: *Biotechnology in feed industry.* (LYONS, T. P., JACQUES, K. A., eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 57-67.
13. FORTES, R. C., V. C. TAVEIRA and M. R. CARVALHO GARBI NOVAES (2006): The immunomodulator role of  $\beta$ -glucans as co-adjuvant for cancer therapy. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 21, 163-168.
14. GALLOIS, M., H. J. ROTHKÖTTER, M. BAILEY, C. R. STOKES and I. P. OSWALD (2009): Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal* 3, 1644-1661.
15. GIANNENAS, I., D. TONTIS and E. ISHAKE (2010a): Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 89, 21-28.
16. GIANNENAS, I., I. S. PAPPAS, S. MAVRIDIS, G. KONTOPIDIS, J. SKOUFOS and I. KYRIAZAKIS (2010b): Performance and antioxidant status of broiler chickens supplemented with dried mushroom (*Agaricus bisporus*) in their diet. *Poult. Sci.* 89, 303-311.
17. GRIMBLE, R. F. (2001): Nutritional modulation of immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 389-397.
18. GUO, F. C., H. F. J. SAVELKOU, R. P. KWAKKEL, B. A. WILLIAMS and M. W. A. VERSTEGEN (2003): Immunoactive, medicinal properties of mushroom and herb polysaccharides and their potential use in chicken diets. *World Poultry Sci. J.* 59, 427-440.
19. HERRE, J., S. GORDON and G. D. BROWN (2004): Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* 40, 869-876.
20. HO, J. C. K., S. C. W. SZE, W. Z. SHEN and W. K. LIU (2004): Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1671, 9-17.
21. JEONG, S. C., Y. T. JEONG, B. K. YANG, R. ISLAM, S. R. KOYALAMUDI, G. PANG, K. Y. CHO and C. H. SONG (2010): White button (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesteremic rats. *Nutr. Res.* 30, 49-56.
22. KIDD, M. T. (2004): Nutrition modulation of immune function in broilers. *Poultry Sci.* 83, 650-657.
23. KLASING, K. C. (2007): Nutrition and the immune system. *Br. Poult. Sci.* 48, 525-537.
24. NOVAK, B. (1997): Uzgoj jestivih i ljekovitih gljiva. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
25. POPOVIĆ, M., M. BALENOVIĆ, K. VLAHOVIĆ, V. SAVIĆ, A. DOVČ, D. KEZIĆ, G. BEZROK, I.



- POPOVIĆ i I. VALPOTIĆ (2007): Citometrijska procjena stanične imunosti u kokoši. Zbornik / BALENOVIĆ, MIRTA (ur.). Zagreb: Grafo 900, 2007. 101-105.
26. POPOVIĆ, M., N. VIJTIUK, M. BALENOVIĆ, I. POPOVIĆ, H. VALPOTIĆ, D. POTOČNJAK, K. VLAHOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2008): Auswirkung des Kapaunisieren auf die Expression von CD Molekülen der Küken-Immunzellen. Tierärztl. Umsch. 63, 566-569.
27. POPOVIĆ, M., M. BALENOVIĆ, A. EKERT KABALIN, V. SAVIĆ, N. VIJTIUK, K. VLAHOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2010): Evaluation of CD45<sup>+</sup> cells kinetics in blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine. Vet. arhiv 80, 61-69.
28. SHEN, J., H. REN, C. TOMIYAMA-MIYAJI, Y. SUGA, T. SUGA, Y. KUWANO, T. IIAI, K. HATAKEYAMA and T. ABO (2007): Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts. Biomed. Res. 28, 71-77.
29. SOLTANIAN, S., E. STUYVENT, E. COX, P. SORGELOOS and P. BOSSIER (2009): Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Crit. Rev. Microbiol. 35, 109-138.
30. TZIANABOS, A. O. (2000): Review - polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clin. Microbiol. Rev. 13, 523-533.
31. VALPOTIĆ, H. (2009): Utjecaj nutraceutika i imunomodulatora na proizvodnost, imunost i zdravstveno stanje odbijene prasadi. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
32. WALLACE, R. J., W. OLESZEK, C. FRANZ, I. HAHN, K. M. BAJER, A. MATHE and K. TEICHMANN (2010): Diatery plant bioactives for poultry health and productivity. Poult. Sci. 51, 461-487.
33. WANI, B. A., R. H. BODHA and A. H. WANI (2010): Nutritional and medicinal importance of mushrooms. J. Med. Plants Res. 4, 2598-2604.
34. WILLIS, W. L., O. S. ISIKHUEMHEN and S. A. IBRAHIM (2007): Performance assessment of broiler chickens given mushroom extract alone or in combination with probiotics. Poult. Sci. 86, 1856-1860.
35. YU, S., V. WEAVER, K. MARTIN and M. T. CANTORNA (2009): The effects of whole mushrooms during inflammation. BMC Immunology 10, 12.

## Immunomodulatory effects of white button *Agaricus bisporus* supplementation in broiler chickens

Gordan. MRŠIĆ, BSc, Assistant, University Study Center for Forensic Sciences, University of Split; Daniel ŠPOLJARIĆ, Assistant, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Lidija KOZACINSKI, DVM, PhD, Full Professor, Ivica VALPOTIĆ, BSc, PhD, Full Professor, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Veterinary Faculty, Zagreb; Mirta BALENOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant-Junior Researcher, Vladimir SAVIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Igor ŠPOLJARIĆ, Center for Forensic Investigations, Research and Expertise "Ivan Vučetić", Zagreb, Siniša SREČEC, BSc, PhD, Full Professor, College of Agriculture, Križevci

Non-clinical use of antibiotic growth promoters (AGP) is declining in poultry production, and there is currently an intensive search for alternative strategies to control and prevent losses of broiler chickens. Immunomodulator substances that stimulate immune system function, but are harmless to consumers and the environment, have proven to be most efficient in the prevention of infections in intensive production. Immunomodulatory properties of mushroom polysaccharides, particularly  $\beta$ -glucans, may provide an adequate alternative to in-feed AGP. In this paper, we evaluated the immunomodulatory effect of a preparation of the white button mushroom (*Agaricus bisporus*) mixed in concentrations of 10 g/

kg or 20 g/kg into commercial feed by flow cytometric analysis of the proportion of CD45<sup>+</sup> lymphoid cells in the peripheral blood of broiler chickens. Namely, broiler chickens fed with either concentration of the white button preparation in the diet had a significantly higher proportion of CD45<sup>+</sup> lymphoid cells ( $p < 0.001$ ) in the peripheral blood at days 14, 28 and 38 of the experiment as compared to the controls. The obtained immunostimulatory effect of the preparation may be considered an indicative parameter for the justification of supplementation of mushrooms (along with their bioactive components  $\beta$ -glucans) into AGP-free diets intended for feeding of broilers in intensive production in the near future.