

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

MATEA VODANOVIĆ

Primjena pentadekapeptida BPC 157 u prihranjivanju pčelinjih zajednica

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet
Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

PREDSTOJNICA:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

MENTORICA:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

Prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli

Dr. sc. Josipa Vlainić, Institut Ruđer Bošković

Izv. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PODACI IZ LITERATURE	3
2.1. Prehrana i prihranjivanje pčelinje zajednice	3
2.2. Probavni sustav medonosne pčele	6
2.3. Nozemoza tipa C.....	7
2.4. Primjena dodataka hrani za pčele u svrhu kontroliranja nozemoze tipa C	9
2.5. Pentadekapeptid BPC 157.....	10
3. MATERIJAL I METODE	12
3.1. Prihranjivanje pčelinjih zajednica pentadekapeptidom BPC 157	12
3.2. Uzorkovanje.....	12
3.3. Laboratorijske pretrage na nozemozu	13
3.3.1. Mikroskopska pretraga.....	13
3.3.2. Višestruki PCR.....	13
3.3.3. Statistička obrada podataka.....	14
4. REZULTATI	15
5. RASPRAVA	17
6. ZAKLJUČCI	19
7. POPIS LITERATURE	20
8. SAŽETAK	23
9. SUMMARY	24
10. ŽIVOTOPIS	25

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger na pruženoj mogućnosti, podršci i savjetima kao i tehničkom osoblju na ukazanoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

1. UVOD

Pčelarstvo je važna gospodarska aktivnost koja pridonosi zaštiti okoliša, održavanju ekološke ravnoteže i očuvanju biološke raznolikosti. Pčele kao najvažniji kukci oprašivači u prirodnim ekosustavima imaju neizostavnu ulogu u povećanju prinosa uzgajanih kultura te bitno doprinose svjetskoj poljoprivrednoj proizvodnji. Smatra se da pčele oprašuju oko jednu trećinu svih poljoprivrednih kultura diljem svijeta (McGREGOR, 1976.; ISAACS i TUELL, 2007.). Osim oprašivačke uloge, uspješnim gospodarenjem pčelinjim zajednicama omogućena je proizvodnja većih količina vrlo cijenjenih pčelinjih proizvoda koji predstavljaju vrijednu namirnicu za stanovništvo.

Medonosnu pčelu (*Apis mellifera*) smatra se najpogodnijom vrstom pčela za suvremeni način pčelarenja zbog njezinih dobrih bioloških i proizvodnih osobina. Kao znanstveno istraživački model danas se koristi u raznim poljoprivrednim i biomedicinskim istraživanjima (TLAK i MATAŠIN, 2007.).

Nozemoza tipa C je bolest odraslih pčela kroničnog tijeka s dugim inkubacijskim razdobljem. Nozemoza uzrokovana mikrosporidijom *Nosema apis* nazvana je nozemoza tipa A, a ona uzrokovana mikrosporidijom *Nosema ceranae*, nozemoza tipa C (ANON, 2009.). Glavno predilekciono mjesto parazitiranja navedenih nametnika je u epitelnim stanicama srednjeg crijeva odrasle pčele u kojima se njihove spore uspješno umnažaju. Pri tome oštećuju invadirane stanice srednjeg crijeva što može dovesti do njihovog propadanja i posljedičnog uginuća pčele. Dugoročno, posljedice invazije sporama *N. ceranae* su preuranjeno ugibanje pčela skupljačica, te moguće propadanje cjelokupnih pčelinjih zajednica. Bolest je raširena u cijelom svijetu te uzrokuje velike ekonomske štete u pčelarstvu. Zbog nedostatka vidljivih simptoma bolest je teško zamjetljiva i pčelari ju često ne uočavaju pa se stoga naziva i “tihim ubojicom” (HORNITZKY, 2005.).

Obzirom da propisi Europske Unije (EU) strogo zabranjuju primjenu antibiotika u suzbijanju i liječenju pčelinjih bolesti, pa tako i nozemoze tipa C, danas su znanstvena istraživanja usmjerena na pronalaženje i ispitivanje učinkovitosti alternativnih tvari u suzbijanju te za europsko zemljopisno područje nove bolesti.

Razlog tome je moguća pojava rezistencije na višestruko uporabljene kemoterapeutike, mogućnost utvrđivanja ostataka rezidua antibiotika ili njihovih sekundarnih metabolita u pčelinjim proizvodima, kao i moguće pojave recidiva i prikrivanja bolesti.

Pentadekapeptid BPC 157 je dobiven sintezom (Patent Sikirić i sur., EP0 572688) i sastoji se od 15 aminokiselina, stabilan je i netoksičan te se može redovito primjenjivati bez dodatnog nosača. Budući je BPC 157 dokazano moguće izdvojiti iz želučanog soka sisavaca, istraživanjima u raznim znanstvenim studijima na životinjama utvrđeno je postojanje nekoliko poveznica između prisutnosti peptida i funkcionalnosti probavnog trakta. Naime, utvrđeno je da BPC 157 pokazuje sposobnost reguliranja i kontroliranja načina rada probavnog sustava. Jedan od načina je da BPC 157 ostvaruje navedeno svojstvo preko zaštite endotela, tankog sloja stanica koje oblažu unutarnju površinu krvnih žila. Drugi način na koji taj peptid obavlja regulatornu funkciju je da predstavlja ključni čimbenik u procesu angiogeneze - procesu u kojem se nove krvne žile formiraju iz već postojećih krvnih žila.

Cilj ovog rada bio je utvrditi učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 tijekom višekratnog prihranjivanja pčelinjih zajednica prirodno invadiranih sporama *N. ceranae*, posebice na smanjenje stupnja invadiranosti, a s pretpostavkom mogućeg utjecaja na brzo zacjeljivanje mikro oštećenja srednjeg crijeva pčele. Inače, ovo je prva opisana primjena peptida BPC 157 u uzgajanim zajednicama korisnih socijalnih kukaca.

2. PODACI IZ LITERATURE

2.1. Prehrana i prihranjivanje pčelinje zajednice

Prihranjivanje pčelinjih zajednica predstavlja jedno je od važnijih vidova, odnosno uvjeta, uspješnog pčelarstva, a kako bi se osigurao njihov pravilan razvoj i jačina. Za optimalnu prehranu pčela potrebne su osnovne hranjive tvari kao što su bjelančevine (aminokiseline), ugljikohidrati (šećeri), lipidi (masne kiseline, steroli), vitamini, minerali (soli) i voda. Prirodna hrana odraslih medonosnih pčela je pelud i nektar kojeg skupljaju u prirodi obilazeći različite vrste biljaka, te med.

Za pravilan razvoj pčelinje zajednice u cjelini neophodna je dobra peludna paša. Pelud osigurava većinu potrebnih bjelančevina, primarno esencijalne aminokiseline, masti, vitamine i zadovoljava potrebe za mineralima. Većina proteinske hrane se iskorištava za rast i razvoj ličinki i mladih pčela. Aktivnost mliječne žlijezde pčela radilica izravno ovisi o prisustvu kvalitetnog peluda i njegove količine, jer u razdoblju kad obavljaju funkciju hraniteljica mlađeg legla one maksimalno proizvode i izlučuju matičnu mliječ, ali kada prestane dostatan priljev peluda tada se bjelančevinaste probavljene hranjive tvari premještaju i iskorištavaju za izgradnju letnog mišićja i funkcioniranje voskovnih žlijezda, dok se u kasno jesen i ljeto izvjesna količina smješta u rezervno masno-bjelančevinasto tijelo pri formiranju tzv. zimske pčele.

Prema WIGGESWORTHU (1984.), navedeno masno-bjelančevinasto tijelo ima značajnu ulogu u pohrani bjelančevina, glikogena i masti, te posjeduje veliki broj mitohondrija i visoku koncentraciju enzima zbog čega zauzima središnje mjesto u intermedijarnom metabolizmu. Insuficijencija i nedostatak pogodne vrste peluda može značajno i ubrzano unazaditi razvoj zajednica, odnosno uzrokovati depopulaciju odraslih pčela. Iz tog razloga poželjno je da pčele imaju pristup više od jedne cvjetne vrste peluda kako bi se uravnotežio ikakav nedostatak koja određena cvjetna vrsta može imati. Sastavni dio peludi su i masti ili lipidi. Fosfolipidi su sastavni dio masnih kiselina, koji imaju funkciju strukturnih elemenata u staničnim membranama i utječu na propustljivost staničnih membrana.

Cvjetni nektar kao prirodni izvor ugljikohidrata pčele skupljaju s biljaka tijekom paše, te ga spremaju u stanice saća unutar košnice. Pretvaranje nektara u med započinje po povratku u košnicu, a odvija se postupno tijekom zrenja. Probava meda odvija se pomoću enzima invertaze i amilaze u srednjem crijevu pčele (NICOLSON i HUMAN, 2008.). Neke ugljikohidrate pčele mogu probaviti i konzumirati, s nekima imaju problema prilikom probave, a neki su im čak i vrlo opasni po zdravlje, odnosno otrovni. Odrasla pčela u metabolizmu ugljikohidrata može iskoristavati fruktozu, glukozu, maltozu, saharozu, trehalozu i melecitozu, a ne može metabolizirati raminozu, ksilozu, arabinozu, galaktozu, manozu, laktozu, rafinozudekstrin, odnosno inulin (BARKER, 1977.). Razlike u stupnju iskorištavanja ugljikohidrata između pčelinjih ličinki i odraslih jedinki se javljaju zbog nedostatka odgovarajućih enzima kod mlađeg legla.

Za kvalitetan uzgoj legla pčele trebaju i vitamine, posebice vitamine C i B kompleksa: tiamin, riboflavin, nikotinamid (nijacin, nikotinska kiselina), piridoksin, pantotemat (pantotenska kiselina), folne kiseline i biotin. Rezultatima istraživanja ROULSTONA i CANEA (2000.) utvrđeno je da pčele mogu samostalno sintetizirati vitamin C.

Voda koju pčele skupljaju pomaže im u održavanju idealne temperature i vlažnosti zraka u košnici te kao otapalo za guste vrste meda. Količina vode koju pčele trebaju i koju će prikupiti ovisi o vanjskim temperaturama zraka, relativnoj vlažnosti, jačini same zajednice te količini legla koju uzgajaju u određenom razdoblju. Djelomične potrebe za vodom pčele mogu podmiriti iz skupljenog nektara i meda. Najveće potrebe za vodom pčelinje zajednice je u proljeće zbog uzgoja i prehrane mladog legla.

Pelud koju prikupljaju medonosne pčele sadrži sve vrijedne minerale, a neki od njih neophodni su za normalan razvoj pčelinje zajednice. Minerali potrebni u prehrani ljudi i drugih kralježnjaka (natrij, kalij, kalcij, magnezij, klor, fosfor, željezo, bakar, jod, mangan, kobalt, cink, nikal) potrebni su i nekim vrstama kukaca, pa tako i pčelama. Natrij, natrij-klorid i kalcij u većim količinama su otrovni za pčele (ZACHARY, 2010.).

Prihranjivanje pčelinje zajednice bitno je zbog održavanja njene jačine u optimalnom stanju, a zbog potrebe intenzivnijeg prikupljanja nektara u vrijeme glavnih paša, oprašivanja poljoprivrednih nasada, proljetno/ljetnog razmnožavanja zajednica - rojenja, uzgoja pčelinjih matica i, naravno, zbog uspješnog prezimljavanja zajednice (BRODSCHNEIDER i CRAILSHEIM, 2010.). Smanjenjem unosa nektara i peluda pčelinja matica instinktivno smanjuje zalijeganje jaja što bi kod dugotrajnijeg takvog ponašanja moglo rezultirati značajnijim padom populacije odraslih pčela u zajednici. Takve situacije depopulacija odraslih mladih pčela, a bez obzira na prikupljene zalihe meda, se događaju za vrijeme ljetnih sušnih razdoblja, odnosno u rano proljeće kada duže razdoblje pada kiša.

Kvalitetna prihrana u rano proljeće kada pelud i nektar nisu dostupni ili su dostupni u manjim količinama ima veoma važnu ulogu u opstanku pčelinje zajednice. Prihranjivati možemo tekućom (npr. šećerni sirup) ili suhom (npr. pogače) hranom. Za koju ćemo se vrstu prihrane odlučiti zavisi od godišnjeg doba, vremenskih i pašnih prilika, udaljenosti pčelinjaka, financijskih sredstava, kao i od cilja samog prihranjivanja. Ako je cilj potaknuti razvoj zajednice i povećati populaciju odraslih pčela, onda je potrebno obratiti pozornost na bjelančevinastu komponentu prehrane (SOMERVILLE, 2000.).

Suhim šećerom se prihranjuju pčele kada ih iz opravdanih razloga treba prihraniti krajem zime, a prerano je za davanje šećernog sirupa. Od svih vrsta šećera glukoza i fruktoza su najzastupljenije u prehrani pčelinjih zajednica, iako pčele skupljaju i disaharide i trisaharide, razlikujući pri tom slatke od ne slatkih šećera. Najpogodnija i najlakša stimulacija razvoja zajednice može se postići prihranjivanjem peludnim pogačama, a kojima se može dodati med, saharozni sirup šećerne repe ili trske. U ranom proljetnom razvoju pored velike rezerve meda, šećerima obogaćene pogače imaju veliku ulogu u razvoju pčelinjih zajednica (MATAK, 2008.). U nedostatku prirodne hrane mogu se tijekom prihranjivanja upotrijebiti umjetni dodatci hrani kao zamjena peludu, kao što je sojino brašno, sušeni pivski ili obični kvasac, obrano mlijeko u prahu, žumanjak jaja u prahu, smjesa vitamina i drugo.

Uz pravilnu prehranu, bitno je pčelama osigurati i stalan pristup pitkoj vodi, ponuđenoj u higijenskim pojilicama.

2.2. Probavni sustav medonosne pčele

Probavni sustav pčele građen je od usnog aparata i probavne cijevi. U pčela je usni aparat prilagođen za grizenje i sisanje. Građen je od prednjeg i stražnjeg dijela. Prednji dio čini gornja usna (labrum) i gornja vilica (mandibula). Stražnji dio je građen od donje vilice (maxilla), donje usne (labium) i rilce (proboscis) (BELČIĆ i sur., 1982.). Probavna cijev građena je od prednjeg, srednjeg i zadnjeg crijeva. Prednje crijevo čine ždrijelo (pharynx), jednjak (oesophagus) i medni mjehur. Ždrijelo je kanal koji povezuje usta s jednjakom. Kroz njega prolazi hrana dalje u probavni sustav. Jednjak je uska cijev koja se proteže od sredine donjeg dijela prsa sve do početka zatka i završava u mednom mjehuru. Specifičnost pčelinjeg probavnog sustava čini medni mjehur, koji je poput ptičje voljke, a služi za skladištenje nektara. Medni mjehur je privremeno skladište za slatku tekućinu - hranu (najčešće nektar), zapremine više od 50 mm^3 (SONGDGRASS i ERICKSON, 2003.) . U njemu se ne odvija probava hrane, jer ne izlučuje probavne sokove. Pčela tijekom skupljanja nektara, dio hrane propušta kroz medni mjehur u srednje crijevo radi potrebe organizma, a ostali dio pohranjuje u saće u košnici gdje daljnjom preradom zrije u konačni proizvod – med.

Pomoću međucrijeva, medni mjehur je povezan sa srednjim crijevom (TOMAŠEC, 1949.). Prednja cijev se dalje nastavlja na srednje crijevo u kojem se odvija probava hrane i apsorpcija osnovnih hranjivih tvari (CHAPMAN, 1978.; CRUZ - LANDIM i sur., 1996.; SONGDGRASS i ERICKSON, 2003.). U njemu su prisutni različiti enzimi zaduženi za probavu hrane kao što su: invertaza, amilaza, lipaza i proteaza. Srednje crijevo je nalik na naboranu cijev dužine 19 mm kod truta, matice 13 mm i radilice do 12 mm (BELČIĆ i sur., 1982.). Stijenka srednjeg crijeva građena je od mišićnog sloja, bazalne membrane i sloja epitelnih cilindričnih stanica. Zadnje crijevo se sastoji od tankog crijeva i rektuma i ima odvodnu funkciju (TOMAŠEC, 1949.). Tanko crijevo se nastavlja na srednje crijevo. Na ulazu u tanko crijevo ulijevaju se Malpighieve cjevčice čija je funkcija izlučivanje štetnih tvari iz organizma – funkcija bubrega kod drugih životinja i ljudi. Ove štetne tvari prvo prolaze kroz tanko crijevo i zatim zajedno s izmetom izlaze u okolinu. Zadnje crijevo završava proširenim dijelom ili rektumom. Stijenka rektuma je naborana i elastična, stoga se šupljina rektuma može povećati nekoliko puta. Zadnje crijevo završava iznad žalca. Pčele izbacuju izmet najčešće tijekom leta, rijetko kada defeciraju unutar košnice, osim ako se pojavi bolest ili ako je zima duga, a vanjske temperature ispod 10° C . Tijekom zime pčelama se izmet

nakuplja u rektumu i kada vanjske temperature porastu primjereno za letnu aktivnost, pčele izlaze iz košnice na pročišne izlete.

2.3. Nozemoza tipa C

Nozemoza je jedna od najučestalijih nametničkih bolesti odraslih pčela uzrokovana *N. apis* ili *N. ceranae*. Predstavlja značajnu prijetnju pčelinjoj populaciji u svijetu. Etiološki oba uzročnika svrstavamo u skupinu mikrosporidija. Donedavno se smatralo da je *N. apis* jedini i isključivi uzročnik nozemoze. Međutim, brojnim istraživanjima uočene su razlike u epizootiologiji, patogenezi i kliničkoj slici ovog oblika nozemoze s novom nozemozom uzrokovanom *N. ceranae*. Nozemoza uzrokovana mikrosporidijom *N. apis* nazvana je nozemoza tipa A, dok je bolest uzrokovana mikrosporidijom *N. ceranae* nazvana nozemoza tipa C (ANON, 2009.).

Bez obzira na zdravstveno stanje zajednice, pojavljuje se u slabijim ali i jakim, prividno zdravim pčelinjim zajednicama. Primijećeno je da klimatske promjene i globalno zagrijavanje pogoduju širenju spora ove mikrosporidije što bi moglo dovesti do još većih šteta u budućnosti pčelarstva. Razlog tome je najvjerojatnije njezina iznimna otpornost i dobra prilagodba na suhu i toplu klimu (MARTIN – HERNANDEZ i sur., 2009.). *N. ceranae* se danas smatra puno virulentnijim i opasnijim nametnikom od *N. apis* (HIGES i sur., 2007.; PAXTON i sur., 2007.; FRIES, 2010.), a invazije su prisutne tijekom cijele godine (HIGES i sur., 2010.). Prosječna spora mikrosporidije *N. apis* veća je za otprilike 1 μ m od spore *N. ceranae* (FRIES i sur., 2006.). Spore mikrosporidije *N. ceranae* izrazito su termostabilne i otporne na isušivanje, ali osjetljive na smrzavanje (FENOY i sur., 2009.). Navedena mikrosporidija nema mitohondrije te posjeduje slabe metaboličke sposobnosti, crpeći energiju od nosioca uzrokuje izrazit energetske stres koji dovodi do brojnih fizioloških promjena i poremećaja u ponašanju pčela. Zbog spomenutog stresa dolazi i do slabljenja imunološkog odgovora. Posljedična imunosupresija pogoduje prijemljivosti pčelinje zajednice i na druge uvjetovane bolesti i ubrzava jačinu invazije mikrosporidijom *N. ceranae*.

Bolest ima kroničan tijek i dugo inkubacijsko razdoblje, te je praćena nespecifičnim simptomima ili češće protječe asimptomatski. Uzročnik se umnaža u epitelnim stanicama srednjega crijeva pčele i posljedično ih razara. Budući da se ovaj nametnik brzo umnaža i invadira velik broj epitelnih stanica srednjeg crijeva pčele, to u velikoj mjeri trpi učinkovitost njene probave. Bolesne pčele ne mogu potpuno probaviti pelud i med, pa troše više hrane no obično. Zbog slabe učinkovitosti probave dolazi do poremećaja i u radu nekih drugih organa. Bolesnim pčelama slabije su razvijene mliječne žlijezde, a u invadirane pčelinje matice slabije su razvijeni jajnici. Svaka sporama opisanog nametnika invadirana pčela živi kraće od zdrave pčele.

Najveći gubici od nozemoze tipa C pojavljuju se u rano proljeće i pred uzimljanje, iako se tzv. depopulaciju odrasle pčele skupljačice može zamijetiti tijekom cijele godine. Često ugiba veliki broj odraslih pčela, zajednica naglo slabi, pa može i sasvim propasti. Život invadiranih pčela je značajno kraći, prethodno ugibanju one slabije njeguju i hrane pčelinje leglo, slabije obavljaju sve kućne zadatke kao i zadatke u vrijeme kad bi morale raditi kao skupljačice. Stoga se nozemozna zajednica uobičajeno slabije razvija, pa daje i manji prinos meda i drugih pčelinjih proizvoda. Invadirane odrasle pčele izmetinama izlučuju velik broj dugoživućih spora uzročnika. Najvažniji put širenja spora uzročnika unutar pčelinje zajednice je fekalno-oralni. Iz jedne pčelinje zajednice u drugu bolest mogu prenositi same pčele biološkim načinima prijenosa (zalijetanje, grabež, trutovi, rojevi, matice). Kao izvor zaraze opasno je saće uprljano izmetinama bolesnih pčela. Bolest može primjenom različitih tehnoloških postupaka na pčelinjaku prenositi sam pčelar, a posebice premještajući okvire sa saćem iz jedne košnice u drugu. Važan su izvor bolesti i napajališta za pčele (posudice s vodom, lokvice). Zbog nedostatka vidljivih simptoma bolest je teško zamjetljiva i često prođe neopaženo od strane pčelara. Također, nije uobičajeno naći uginule pčele u blizini košnice, što može biti posljedica njihove dezorijentiranosti ili su preslabe te uobičajeno ugibaju od gladi i iscrpljenosti izvan košnice.

2.4. Primjena dodataka hrani za pčele u svrhu kontroliranja nozemoze tipa C

U svrhu kontroliranja i sprečavanja nastanka pčelinjih bolesti nužno je provoditi profilaktičke mjere. Osnovna mjera za suzbijanje nozemoze je provesti pravilno uzimljanje pčelinjih zajednica. U prvom redu valja nastojati da se uzimljuju jake pčelinje zajednice s dobro razvijenim imunskim sustavom koje su najučinkovitije u borbi protiv nozemoze (RIBARIĆ, 2016.). Nadalje valja nastojati da se pčele neposredno prije pripreme za zimovanje prihrani već u kasno ljeto ili ranu jesen, dok matica još polaže jaja. Veoma je korisna i peludna paša u ranu jesen jer ona pobuđuje maticu na zanošenje legla, a radilicama omogućava stvaranje masno bjelančevinastog tijela u organizmu, kao rezervu za zimu. Dovoljna količina kvalitetne hrane pohranjene u saću u košnici te ne otvaranje košnice predstavljaju glavne uvjete dobrog zimovanja. Pčele ne smiju zimovati isključivo na medu medljikovcu jer je on teško probavljiv i često otrovan, a budući sadrži veće količine minerala može dodatno oštećivati stjenku srednjeg crijeva. Svakako je nužno potrebno redovito svake druge godine mijenjati pčelinju maticu.

Budući ne postoji registriran i odobren veterinarsko medicinski proizvod za tretiranje pčelinjih zajednica protiv nozemoze tipa C nužno je potrebno prilikom prihranjivanja zajednica dodavati različite dodatke hrani (biljnog, vitaminsko-mineralnog ili proteinskog sastava) koji u većoj ili manjoj mjeri mogu suprimirati umnažanje spora *N. ceranae*, a posljedično tome smanjiti stupanj invadiranosti sporama navedenog nametnika. Iako bolesnu zajednicu primjenom dodataka hrani za pčele nije moguće u potpunosti izliječiti, može se značajno utjecati na omogućavanje suživota opisanog nametnika i invadirane pčelinje zajednice (TLAK GAJGER i sur., 2015.).

Aminokiseline su neophodni sastavni dio ishrane medonosnih pčela te su potrebne za normalan rast i fiziološki razvoj te proizvodnju mliječne i voskovne žlijezde. BEEWELL AminoPlus je dodatak hrani za pčele namijenjen prevenciji bolesti i jačanju imuniteta pčelinje zajednice, a sadrži brojne aminokiseline i vitamine. U poljskim pokusima pokazao je relativno dobre rezultate u smislu smanjenja broja spora *N. ceranae* u prirodno invadiranih i višekratno prihranjivanih pčelinjih zajednica (KRZNAR i sur., 2015.).

Fitofarmakološki biljni dodatak hrani za pčele bogat polifenolima taninima Nozevit dokazano učinkovito djeluje na smanjenje spora uzročnika *Nosema* spp. nakon tretiranja pčelinjih zajednica, a također sprječava pojavu proljeva u bolesnih pčela, pri čemu se smanjuje širenje bolesti unutar zajednice (TLAK GAJGER i sur., 2009a.; 2009b.; 2011.).

Zeoliti su kristalni aluminosilikatni minerali koji sadrže alkalijske i zemno alkalijske metale koji posjeduju trodimenzionalnu strukturu izgrađenu od aluminijevih, silicijevih i kisikovih atoma. Eko ZeoPet je prirodni funkcionalni mineralni dodatak hrani za sve vrste kućnih ljubimaca koji sadrži zeolit vulkanskog podrijetla, odnosno prirodni mineralni klinoptilolit. Dodatak stimulira metabolizam i pravilan rad probavnog sustava, pospješuje zarastanje rana te veže i neutralizira mikotoksine. Primijenjen je kao dodatak hrani za pčele u svrhu tretiranja zajednica protiv nozemoze tipa C (TLAK GAJGER i sur., 2015.).

Normativni akti u EU zabranjuju uporabu antibiotika, pa i fumagilina, u liječenju nozemoze i drugih pčelinjih bolesti zbog pojave ostataka štetnih tvari u pčelinjim proizvodima. Brzo širenje mikrosporidije *N. ceranae* diljem svijeta te velikih gospodarskih šteta koje uzrokuje bolest, ukazuju na nužnost uporabe alternativnih načina liječenja pčelinjih zajednica.

2.5. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 je dobiven sintezom (Patent Sikirić i sur., EP0 572688) i sastoji se od 15 aminokiselina (Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val), molekularne težine 40 000 D. Prednosti pentadekapeptida BPC 157 u odnosu na druge peptide očituju se u tome što je stabilan i u uvjetima koji inače dovode do brze razgradnje peptida, te što se može redovito primjenjivati bez nosača i što je u potpunosti netoksičan (SIKIRIC i sur., 1993.). Naime, pentadekapeptid BPC 157 nije se razgradio niti nakon 24 sata tijekom kojih je bio inkubiran u želučanome soku za razliku od drugih peptida, primjerice hEGF i h-TGH, koji su se raspali već nakon petnaestak minuta inkubacije u istom mediju.

Inicijalna su istraživanja pokazala su da primjena pentadekapeptida BPC 157 pomaže u cijeljenju dubokih kožnih opekline te posljedične stresne želučane lezije (SEIWERTH i sur., 1997.). Ukazano je da i lokalna i sistemska primjena BPC 157 dovode do ubrzanog cijeljenja takvih lezija. Jasno su pokazani i njegovi učinci na strukturu granulacijskog tkiva prilikom cijeljenja rane. Poznato je da granulacijsko tkivo, koje se sastoji od fibroblasta koji stvaraju kolagen, kolagenih vlakana te novostvorenih krvnih žila čini bazičnu strukturu u procesu cijeljenja (SIKIRIC i sur., 2008.). Pozitivan se učinak pentadekapeptida BPC 157 u prvome redu pripisuje snažnom angiogenom učinku. Uz već spomenuti angiogeni učinak valja istaknuti i antiinflamatorni učinak te tvari. Tako je uočeno da primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze u području ozljede (SIKIRIC i sur., 2008.). Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je i sposobnost poticanja sinteze dušik oksida blokiranjem N-nitro-L-arginin metil-estera inhibitora enzima dušik oksid sintetaze što djeluje stimulatивно na proces cijeljenja, i to u ranom razdoblju svojim snažnim vazodilatacijskim učinkom, dok kasnije aktivacija dušik oksidacijskog sustava potiče i sintezu kolagena (KLICEK i sur., 2008.).

Obzirom na porijeklo peptida BPC 157, dosad je primarni fokus bio istražiti njegove učinke na cijeljenje gastrointestinalnih lezija u sisavaca. Pri tome pokazao se učinkovitim u cijeljenju izazvanih lezija kako u prednjem tako i u stražnjem probavnom kanalu (SIKIRIC i sur., 2010.). BPC 157 pozitivno djeluje na akutne i na kronične lezije na način da sprečava njihovu pojavu ili umanjuje postojeće (SIKIRIC i sur., 2008.). Jednako dobri rezultati postignuti su oralnom, parantalnom ili izravnom lokalnom primjenom u liječenju različitih tkiva (SIKIRIC i sur., 2008.). U usporedbi s drugim istraženim peptidima kao mogućim protektorima očuvanja integriteta mukoze (sekretin, glukagon, somastotin) ili konvencionalnih sredstava (antagonisti H2 receptora, dopamin) BPC 157 se pokazao čak i učinkovitijim (BILIC i sur., 2011.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Prihranjivanje pčelinjih zajednica pentadekapeptidom BPC 157

Istraživanje je provedeno na pčelinjaku smještenom u kontinentalnom dijelu Hrvatske, tijekom 2014. godine. Pokus je postavljen na ukupno 10 nasumično odabranih pčelinjih zajednica prirodno invadiranih mikrosporidijom *N. ceranae*. Pčelinje zajednice podijeljene su na pokusnu i kontrolnu skupinu. Svaka pokusna skupina bila je sastavljena od pet pčelinjih zajednica i svaka je imala kontrolnu skupinu sastavljenu od pet pčelinjih zajednica. Sve pokusne pčelinje zajednice višekratno su, u hranilici, pojedinačno prihranjivane 0,25L otopine šećernog sirupa pripremljenog u omjeru 1:1 i obogaćenog s 0,1µg/mL BPC157; tijekom 30 uzastopnih dana. Kontrolne pčelinje zajednice dobivale su isključivo 0,25L otopine šećernog sirupa, bez dodataka. Svježe pripremljena šećerna otopina ulivena je u plastičnu hranilicu i zatvorena krovom košnice do slijedećeg prihranjivanja. Prihranjivanje je izvršeno 1., 10., 20. i 30. dana od početka pokusa.

Tijekom provođenja pokusa pčelinje zajednice nisu bile tretirane drugim veterinarsko medicinskim pripravcima.

3.2. Uzorkovanje

Iz svake pčelinje zajednice prije svakog tretiranja i posljednji put nakon završetka tretiranja uzorkovano je 30 do 60 odraslih pčela s leta, (odrasle pčele skupljačice) u označene plastične vrećice. Uzorci su dostavljeni u laboratorij, u kojem su do analize bili pohranjeni na temperaturi od -20°C. Pčele skupljačice uzorkovane su prilikom njihovog povratka s paše oko podneva. Na tridesetak minuta komadima spužve zatvoreno je leto košnice te je pčelama skupljačicama tako onemogućen ulazak u košnicu. Otprilike pola pčela iz svakog uzorka upotrijebljeno je za laboratorijsko utvrđivanje broja spora *Nosema* sp., a preostale za molekularno diferencijalno dijagnosticiranje vrsne specifičnosti.

3.3. Laboratorijske pretrage na nozemozu

3.3.1. Mikroskopska pretraga

U laboratorij dostavljene uzorke odraslih pčela smo homogenizirali te potom mikroskopski pretražili na prisutnost spora iz roda *Nosema*. Pri tome smo iz svakog uzorka nasumično odabrali deset pčela koje su zgnječene plastičnim štapićem u čaši u koju je prethodno dodano 5mL destilirane vode. Homogenat zgnječenih pčela uz dodavanje preostalih 5mL destilirane vode je profiltriran. Nativne razmaske homogenata pčela dobivenih na opisani način pretražili smo svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41 pod povećanjem 400 puta i uporabom faznog kontrasta. Broj spora *Nosema* spp. utvrdili smo brojanjem spora pomoću hemocitometra po Burker- Turku (CANTWELL, 1970.; ANON, 2013.).

3.3.2. Višestruki PCR

PCR je osjetljiva i specifična molekularna metoda umnažanja određenog odsječka DNK u uvjetima *in vitro*. Uzorke homogenata pčela zgnječenih na isti način kao i za pretragu svjetlosnim mikroskopom uporabili smo za provođenje višestrukog PCRa. Da bi se izazvalo mehaničko pucanje spora *Nosema* sp. od svake suspenzije pojedinog uzorka 50 μ L preliveno je u novu Ependorf tubicu koju smo zagrijavali u termobloku pri 100 °C tijekom 30 minuta. Izdvajanje genomske DNK proveli smo na način da smo prokuhane uzorke spora centrifugirali na 1400 g tijekom deset minuta. Zatim smo 30 μ l supernatanta izdvojili i nadopunili s 10x TAE pufera do konačne koncentracije od 10mM i 5 mM EDTA, pri pH 8. Navedeni supernatant nam je služio kao izvor DNK za daljnje analize. Uzorci su pohranjeni na temperaturi -20 °C ili smo ih izravno koristili za višestruki PCR.

PCR reakciju proveli smo prema TLAK GAJGER i suradnici (2010.). Molekularnu veličinu PCR proizvoda odredili smo elektroforezom u 2%- tnom agarozu TAE (tris-acetat-etilen diamin tetra octena kiselina) gelu sa standardnim TAE puferom obojenim sa SYBR zelenom bojom. Sa svrhom vizualizacije koristili smo UviTec gel dokumentacijski sustav.

3.3.3. Statistička obrada podataka

U cilju određivanja razlika u broju spora između pokusnih i kontrolnih skupina pčelinjih zajednica uzorkovanih 1., 10., 20. i 30. dana pokusa primijenjen je modul za računanje univarijatne analize varijance (one-way ANOVA), a u cilju usporedbe dviju skupina neparametrijski Mann-Whitney U-test. Za statističku analizu podataka korišten je program STATISTICA 7.0 (StatSoft inc., 2004.). Procjena statističke značajnosti provedena je koristeći razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ što odgovara razini pouzdanosti od 95%.

4. REZULTATI

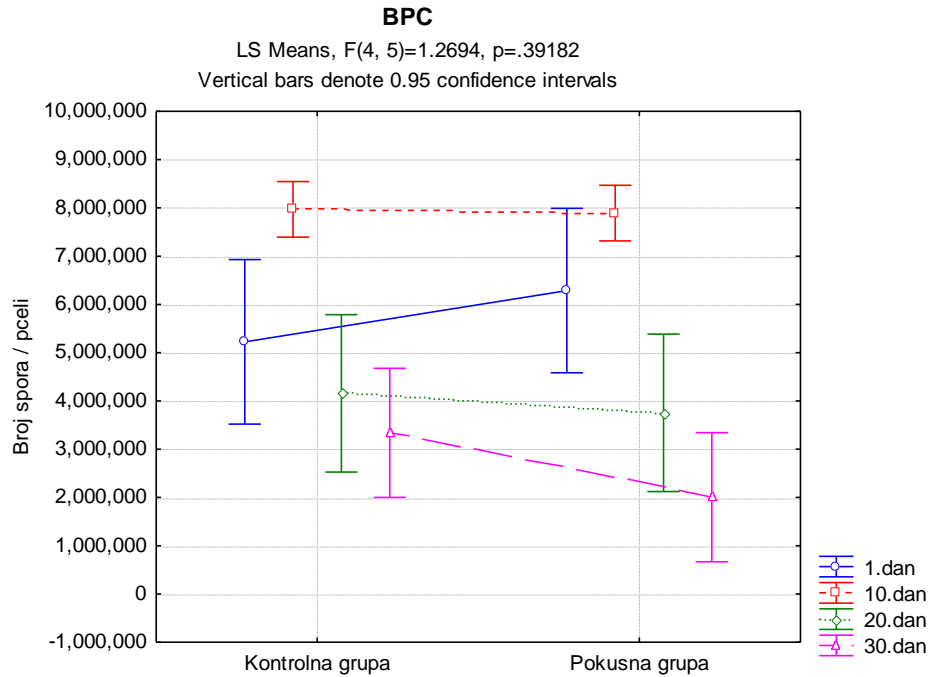
Primjenom višestrukog PCRa u svim uzorcima homogenata odraslih pčela utvrđena je invazija pčelinjih zajednica mikrosporidijom *N. ceranae*.

Broj spora *N. ceranae* utvrđen prije, te 10., 20. i 30. dana od početka prihranjivanja pčelinjih zajednica šećernim sirupom s dodatkom peptida BPC 157 prikazan je u Tablici 1. te Grafikonima 1. i 2.

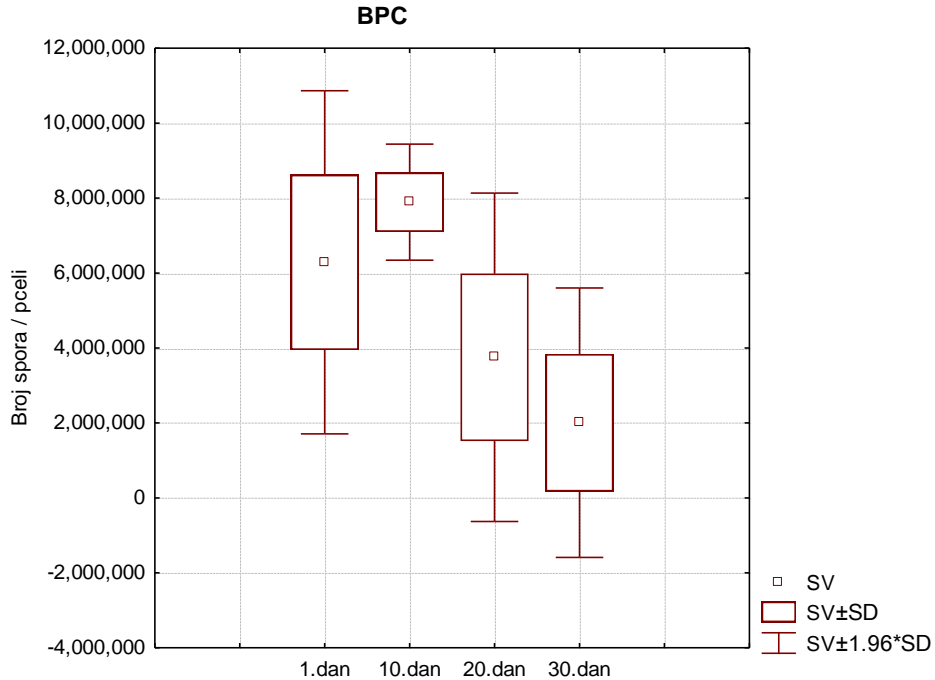
Tablica 1. Srednja vrijednost broja spora *N. ceranae* po pčeli utvrđena prije, te 10., 20. i 30. dana od početka prihranjivanja šećernim sirupom s dodatkom hrani BPC 157.

Broj spora <i>N. ceranae</i> prije i nakon prihranjivanja dodatkom hrani za pčele BPC 157				
Mjerenje	Srednja vrijednost (SV)	Min	Max	Standardna devijacija (SD)
1. dan	6,286,458.00	3,791,667.00	9,828,125.00	2,336,209.00
10. dan	7,891,667.00	6,625,000.00	8,583,333.00	789,861.00
20. dan	3,753,125.00	744,792.00	6,208,333.00	2,235,803.00
30. dan	2,005,208.00	93,750.00	4,703,125.00	1,834,232.00

Razlike srednjih vrijednosti utvrđenog broja spora *N. ceranae* po pčeli između pokusnih i kontrolnih skupina su statistički značajne ($p=0.039182$; $p>0.05$).



Grafikon 1. Srednja vrijednost broja spora *N. ceranae* po pčeli utvrđena prije, te 10., 20. i 30. dana od početka prihranjivanja šećernim sirupom s dodatkom hrani BPC 157.



Grafikon 2. Srednja vrijednost i standardna devijacija broja spora *N. ceranae* po pčeli utvrđena prije, te 10., 20. i 30. dana od početka prihranjivanja šećernim sirupom s dodatkom hrani BPC 157; Box & Whisker plot.

5. RASPRAVA

Nozemoza tipa C je nametnička bolest odraslih pčela koja zbog asimptomatske prirode, složene i nedovoljno istražene patogeneze kao i ne dozvoljene uporabe antibiotika predstavlja ozbiljan problem u pčelarstvu diljem svijeta. Višestrukom PCR reakcijom na svim uzorcima homogenata odraslih pčela utvrđena je prisutnost mikrosporidije *N. ceranae*, dok *N. apis* nije uopće utvrđena. Ovakvi rezultati sukladni su nizu objavljenih istraživanja (KLEE i sur., 2007.; COX-FOSTER i sur., 2007.; HIGES i sur., 2008.a; TRAVER i FELL 2011.b) i ne iznenađuju obzirom na globalnu zemljopisnu proširenost navedenog nametnika.

Rezultati ovog istraživanja također dodatno doprinose istovjetnosti rezultata prethodno provedenog istraživanja TLAK GAJGER i suradnika (2010.b) o prisutnosti i proširenosti ovog nametnika diljem Hrvatske.

U provedenom istraživanju sve pčelinje zajednice, i pokusne i kontrolne skupine, pojele su ponuđenu količinu šećernog sirupa, odnosno šećernog sirupa s dodatkom pentadekapeptida BPC 157. Tijekom istraživanja u pčelinjim zajednicama nije uočeno povećano ugibanje odraslih pčela, niti bilo koji drugi negativan učinak prihranjivanja.

Pentadekapeptid BPC 157 ima dokazani utjecaj na različite organske sustave, no s obzirom na temu ovog istraživačkog rada najvažniji je njegov utjecaj na gastrointestinalni sustav. Zapažen je njegov pozitivan učinak na cijeli gastrointestinalni sustav u sisavaca te se doima kako djeluje kao endogeni ligand bilo kojeg od procesa cijeljenja (SIKIRIC i sur., 2010.). Pentadekapeptid BPC 157 uspješno pomaže u cijeljenju intestinalnih anastomoza u štakora (VUKSIC i sur., 2007.) i ima dokazanu ulogu u cijeljenju želučanih i crijevnih fistula (KLICEK i sur., 2008.) Također, pokazuje široki antiulkusni potencijal (VELJACA i sur., 2003.), a provedena istraživanja se između ostalog odnose na njegovo djelovanje na crijeva (VUKSIC i sur., 2007.).

U ovom istraživanju prosječan broj spora *N. ceranae* u pčelinjim zajednicama prihranjivanim dodatkom BPC 157 kretao se od $6,3 \times 10^6$ pri inicijalnom uzorkovanju do $2,0 \times 10^6$ na završetku istraživanja (Tablica 1.).

Utvrđeno je kontinuirano smanjenje broja spora *N. ceranae*, te je Mann-Whitney U testom potvrđeno da su razlike srednjih vrijednosti broja spora navedenog nametnika po pčeli, između pokusnih i kontrolnih skupina pčelinjih zajednica, statistički značajne ($p < 0.05$).

Iako nije došlo do potpunog izlječenja invadiranih pčelinjih zajednica, kod zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s dodatkom peptida BPC 157 došlo je do značajnog smanjenja broja spora: 40,3% 20. dana i 68,1% 30. dana od početka prihranjivanja. U svim kontrolnim skupinama pčelinjih zajednica ukupan broj spora *N. ceranae* nije se značajnije mijenjao tijekom cijelog poljskog pokusa.

Razlog slabijoj učinkovitosti od očekivane nakon primjene BPC 157 dodatka šećernom sirupu kao hrani za pčele u smanjenju broja spora *N. ceranae* nakon prihranjivanja invadiranih pčelinjih zajednica vjerojatno se može pripisati lošim klimatskim prilikama s velikim količinama kiša i visokoj relativnoj vlažnosti tijekom aktivne pčelarske sezone, te posljedično slabim pašnim prilikama tijekom 2014. godine.

Uspoređujući rezultate prihranjivanja s drugim dodacima hrani za pčele (KRZNAR i sur., 2015.; TLAK GAJGER i sur., 2009.a; 2013.; 2015.) primjena peptida BPC 157 pokazala je relativno dobru učinkovitost.

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati višestruke PCR reakcije primjenom specifičnih parova početnica svih pretraženih uzoraka homogenata odraslih pčela bili su pozitivni na prisutnost mikrosporidije *N. ceranae*.
2. Nakon trideset dana od inicijalnog uzorkovanja i početka prihranjivanja pokusnih pčelinjih zajednica šećernim sirupom s dodatkom peptida BPC 157, u uzorcima pretraživanih odraslih pčela utvrđeno je smanjenje broja spora *N. ceranae* za 68,1%.
3. U svim kontrolnim skupinama pčelinjih zajednica koje su prihranjivane isključivo šećernim sirupom broj spora *N. ceranae* bio je približno jednak broju spora *N. ceranae* utvrđenih u uzorcima odraslih pčela prilikom prvog uzorkovanja i nije se značajnije mijenjao tijekom cijelog pokusa.
4. Ovo istraživanje predstavlja prvu primjenu pentadekapeptida BPC 157 u pčelinjim zajednicama kao uzgajanim korisnim socijalnim kukcima, a u svrhu kontroliranja broja spora *N. ceranae*.

7. POPIS LITERATURE

ANON (2008): Nosemosis of honey bees.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2-02.04_NOSEMOSIS.pdf.

ANTUNEZ, K., R. MARTIN-HERNANDEZ, L. PREIETO, A. MEANA, P. ZUNINO, M. HIGES (2009): Immune supresion in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). Environ. Microbiol. Doi: 10. 1111/j. 1462 – 2920.2009.01953.x.

BAILEY, L., B. BALL (1991): Honey bee pathology, Academic press, London, UK, 124.

BARKER, R. J. (1977): Some Carbohydrates Found in Pollen and Poleen Substitues are Toxic to Honey Bees. J. Nutrit. 107, 1859-1862.

BELČIĆ, J., J. KATALINIĆ, D. LOC, S. LONČAREVIĆ, L. PERADIN, F. ŠIMIĆ, I. TOMAŠEC (1982): Pčelarstvo. Nakladni zavod Znanje, Zagreb.

BILIC, I., I. ZORICIC, T. ANIC, J. SEPAROVIC, D. STANCIC-ROKOTOV, D. MIKUS, G. BULJAT, D. IVANKOVIC, G. ARALICA, I. PRKACIN, D. PEROVIC, S. MISE, I. ROTKVIC, M. PETEK, R. RUCMAN, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2001): Haloperidol stomach induced lesions attenuation by pentadecapeptide BPC-157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. Life Sci. 68, 1905-1912.

BRODSCHNEIDER, R., K. CRAILSHEIM (2010): Nutrition and health in honey bees. Apidologie 41, 278-294.

CANTWELL, G. E. (1970): Standard methods for counting *Nosema* spores. Am. Bee J. 110, 222-223.

CHAPMAN, R. F. (1978): The insects structure and function. Engl. Press. Ltd, London, England, 819.

FENOY, S., C. RUEDA, M. HIGES, R. MARTIN-HERNANDEZ, C. DEL AGUILA (2009): High - level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Appl. Environ. Microb. 75, 21, 6886-6889.

FRIES, I., R. MARTIN, A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, M. HIGES (2006): Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. J. Apicult. Res. 45, 3, 230-233.

HIGES, M., P. GARCIA- PALENCIA, R. MARTIN- HERNANDEZ, A. MEANA (2007): Experimental infection of *Apis mellifera* honeybee with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Intervertebr. Pathol. 94, 211-217.

HORNITZKY, M. (2005): A report for the Rural Industries Research and Development Corporations. Publication No. 03/028. Rural Industries Research and development Corporation, Barton, Australia, 1-16.

KLICEK, R., M. SEVER, B. RADIC, D. DRMIC, I. KOCMAN, I. ZORICIC, T. VUKSIC, M. IVICA, I. BARISIC, S. ILIC, L. BERKOPIC, H. VRCIC, L. BRCIC, A. BOBAN BLAGAIC, M. CORIC, I. BRCIC, D. STANCIC ROKOTOV, T. ANIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2008): Pentadecapeptide BPC 157 in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736) is effective in healing of colcutaneous fistulas in rats: role of nitric oxide-system. J. Pharmacol. Sci. 108, 7-17.

KOKIĆ, N. (2005): Učinak pentadekapeptida BPC 157 na subhondralnu kost kondilnog nastavka mandibule, funkciju i transmandibularni koštani defekt u modelu kirurški inducirane osteoartroze čeljusnog zgloba štakora. Doktorski rad. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

KRZJAR, M., J. RIBARIĆ, K. PUŽAR, D. CVITKOVIĆ, S. NEJEDLI, I. TLAK GAJGER (2015): Utjecaj prihrane pčela dodatkom hrani BeeWell AminoPlus na broj spora *Nosema* sp. – preliminarno istraživanje. Vet. stn. 46, 459-466.

MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, P. MARIN, C. BOTIAS, E. GARRIDO-BAILON, L. BARRIOS, M. HIGES (2009): Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. Appl Environ. Microb. 75, 8, 2554-2557.

MATAK, M. (2014): Utjecaj prihrane pčela Eko ZeoPet mineralnim dodatkom na aktivnost enzima leucin-aminopeptidaze. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

NICOLSON, S. W., H. HUMAN (2008): Bees get a head start on honey production. Biol. Lett. 4, 299-301.

RIBARIĆ, J. (2016): Utjecaj dodataka hrani na stupanj invazije mikrosporidijom *Nosema ceranae*, biokemijske i histokemijske pokazatelje u medonosne pčele (*Apis mellifera*). Doktorski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

ROULSTON, T. H., J. H. CANE (2000): Poleen nutritional content and digestibility for animals. Plant. Syst. Evol. 222, 187-209.

SEIWERTH, S., P. SIKIRIC, Z. GRABAREVIC, I. ZORICIC, M. HANZEVACKI, D. LJUBANOVIC, V. CORIC, P. KONJEVODA, M. PETEK, R. RUCMAN, B. TURKOVIC, D. PEROVIC, D. MIKUS, S. JANDRIJEVIC, M. MEDVIDOVIC, T. TADIC, B. ROMAC, J. KOS, J. PERIC, Z. KOLEGA (1997): BPC 157' s effect on healing. J. Physiol. Paris 91, 173-178.

SIKIRIC, P, M. PETEK, R. RUCMAN, S. SEIWERTH, Z. GRABAREVIĆ, I. ROTKVIĆ, B. TURKOVIĆ, V. JAGIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK, N. LANG (1993): A new gastric juice peptide BPC. An overview of stomach – stress – organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. J. Physiol. Paris 87, 313-327.

SIKIRIC, P., S. SEIWERTH, L. BRCIC, A. B. BLAGAIC, I. ZORICIC, M. SEVER, R. KLICEK, B. RADIC, N. KELLER, K. SIPOS, A. JAKIR, M. UDOVICIC, A. TONKIC, N. KOKIC, B. TURKOVIC, S. MISE, T. ANIC (2006): Stable gastric pentadecapeptid BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacol.* 14, 214-221.

SIKIRIC, P, S. SEIWERTH, L. BRCIC, M. SEVER, R. KLICEK, B. RADIC, D. DRMIC, S. ILIC, D. KOLENC (2010): Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr. Pharm. Design* 16, 1224-1234.

SOMERVILLE; D. (2000): Honey bee nutrition and supplementary feeding. *Agnote NSW Agriculture*.

TLAK GAJGER, I., M. TOPLEK, Z. TOMLJANOVIĆ (2014): Influence of additional feeding of honeybee colonies with Eko ZeoPet mineral supplement on numbers of *Nosema ceranae* spores. *Zbornik radova 1. Znanstveno posvetovanje o čebelarstvu, Ljubljana*, 13 – 16.

TLAK. I., Ž.MATAŠIN (2007): Genome of the honeybee (*Apis mellifera*). *Hrv. Vet.. Vjesn.* 30, 57-62.

TOMAŠEC, I. (1949): *Biologija pčela*. Nakladni zavod Hrvatske. Zagreb.

VUKSIC, T., I. ZORICIC, L. BRCIC, M. SEVER, R. KLICEK, B. RADIC, V. CESAREC, L. BERKOPIC, N. KELLER, A. B. BLAGAIC, N. KOKIC, I. JELIC, J. GEBER, T. ANIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2007): Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, Pliva, Croatia) heals ileoileal-anastomosis in rat. *Surg. Today* 37, 768-777.

VELJACA, M, D. PAVIC SLADOLJEV, B. MILDNER, K. BRAJSA, M. BUBENIK, S. STIPANICIC, M. TABAK SLOSIC, L. BRNIC, M. Z. I. KHAN, Z. KRZNDARIC, A. BISCHOFF, A. SCHRODTER, W. D. VAN DONGEN, F. VAN SCHAIK (2003): Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut* 51 (Suppl III), A309.

WIGGLESWORTH, V. B. (1984): *Insect physiology*. Chapman and Hall. London.

ZACHARY, H. (2010) : Honey bee nutrition.
<http://www.beeccdacp.uga.edu/documents/CAPArticle10.html>.

8. SAŽETAK

Medonosnu pčelu (*Apis mellifera*) smatra se najpogodnijom vrstom pčela za suvremeni način pčelarenja zbog njezinih dobrih bioloških i proizvodnih osobina. Nozemoza je nametnička bolest pčela uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Nozemoza tipa C izrazito je patogena bolest kroničnog tijeka s dugim inkubacijskim razdobljem, a najčešće prolazi asimptomatski ili se manifestira nespecifičnim simptomima poput postepenog slabljenja pčelinjih zajednica, povećanog stupnja ugibanja odraslih pčela i posljedično smanjenja proizvodnje meda. Zbog asimptomatske prirode, izrazite patogenosti kao i zabranjene uporabe antibiotika, nozemoza tipa C predstavlja ozbiljan problem u suvremenom pčelarstvu. Obzirom na ovu problematiku, danas su znanstvena istraživanja usmjerena na ispitivanje učinkovitosti prirodnih tvari u kontroliranju i suzbijanju nozemoze.

BPC 157 je visoko stabilan protein koji se koristi bez nosača, sistemski i lokalno. Dosadašnja istraživanja na sisavcima su pokazala da znatno unaprjeđuje cijeljenje različitih tkiva. Stoga je cilj ovoga rada bio utvrditi utjecaj primjene pentadekapeptida BPC 157 u obliku dodatka hrani tijekom jesenskog prihranjivanja na broj spora *N. ceranae*, a s pretpostavkom o mogućem utjecaju na zacjeljivanje mikro oštećenja srednjeg crijeva medonosne pčele.

Ključne riječi: medonosna pčela, nozemoza, BPC 157.

9. SUMMARY

APPLIANCE OF PENTADECAPETID BPC-157 IN ADDITIONAL FEEDING OF HONEYBEE (*Apis mellifera*)

Honeybee (*Apis mellifera*) is considered one of the most favorable species of bees for modern way of beekeeping because of her good biological and producing characteristics. Nosemosis is a parasitic disease of adult honeybees, caused by microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Nosemosis type C is a significantly pathogenic disease with chronic course and long incubation period, which usually passes asymptotically or manifests by nonspecific symptoms like gradual weakening of honeybee colonies, enhanced loss of adult bees and decreased production of honey. Because of asymptomatic nature, significant pathogenic and prohibited use of antibiotics, nosemosis type C represents serious problem in modern beekeeping. Regarding this issues, the researches today are focused on determination of effectiveness of natural substances in controlling and combating nosemosis.

BPC 157 is a high stable protein, which is used without carrier, systematically and locally. The researchers on mammals showed that it considerably enhances healing of different matter.

So, the aim of this research was to determine the effect of applying pentadecapeptide 157 as food supplement during autumn additional feeding on a number of *N. ceranae* spores, and with presumption about possible effect on healing micro damages of honeybee middle intestine.

Key words: honey bee, nosemosis, BPC 157.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. veljače 1989. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, upisala sam Zdravstveno učilište u Zagrebu, smjer dentalni tehničar, gdje sam maturirala 2007. godine. Iste godine počela sam odrađivati staž u zubotehničkom laboratoriju, koji sam završila 2008. godine. Iste godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.