

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ TANINOV NA ŽLEZE
SLINAVKE PRI MERJAŠČKIH**

**INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
HYDROLYSABLE TANNINS ON SALIVARY GLANDS IN
BOARS**

Maša Rutar

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.4.084.5:637.5:577.19:547.753:547.98:612.313:616-018(043.2)

**VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ TANINOV NA ŽLEZE
SLINAVKE PRI MERJAŠČKIH**

**INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
HYDROLYSABLE TANNINS ON SALIVARY GLANDS IN
BOARS**

Maša Rutar

Delo je bilo pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Valentine Kubale in somentorstvom izr. prof. dr. Marjete Čandek - Potokar na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete v Ljubljani v okviru projekta ARRS (L4-5521: Reja merjaščkov ali imunokastracija: raziskave ukrepov za zmanjševanje vonja po merjascu in novih problemov kakovosti proizvodov) ter raziskovalnih programov P4-0053 in P4-0133.

Ljubljana, 2017

POVZETEK

Ključne besede: Prašiči – rast in razvoj; feromoni – škodljivi učinki; prehranski dodatki – analize; tanini – analiza; skatol – škodljivi učinki; androstenon – biosinteza; slinske žleze – imunohistokemija; histološke tehnike; samci

Vonj po merjascu, ki ga primarno povzročata androstenon in skatol je v mesu nezaželen. V ta namen se merjaščki kirurško kastrirajo brez anestezije in analgezije, kar je za dobrobit živali vedno manj sprejemljivo in vedno bolj kritizirano. V Evropi obstaja prostovoljna iniciativa po ukinitvi te prakse do leta 2018, zato je pomembno raziskati alternative in dejavnike, ki lahko zmanjšajo vonj po merjaščkih. Ena izmed alternativ je preiskovanje učinkov sestavin krme (tanina) na zmanjšanje vonja. Cilj našega raziskovanja je bil preučiti vpliv hidrolizirajočih taninov v prehrani merjaščkov, in sicer vpliv prehrane bogate s tanini na morfologijo žlez slinavk. Študija je bila izvedena na 29 merjaščkih, križancih pasem Landrace x Large white, ki so bili razdeljeni v 5 skupin: kontrolno skupino (T0 – krmljena s krmo, ki je vsebovala 13,2 MJ metabolne energije ME/kg, 15,6 odstotkov surovih proteinov brez dodatka taninskega pripravka) ter poskusne skupine, pri katerih je bil krmlilu dodan 1 odstotek (T1), 2 odstotka (T2), 3 odstotke (T3) taninskega pripravka Farmatan® ali mikroenkapsulirana (MT) oblika (1,5 odstotka) pripravka. Poskus je trajal 10 tednov. Merjaščki so bili zaklani pri teži 122 ± 10 kg. Po zakolu smo odvzeli levo podušesno in spodnječeljustno slinsko žlezo, ju stehtali ter vzorce shranili v 10-odstotnem puferiranem formalinu. Vzorci tkiva so biliobarvani s hematoksilin-eozinskim barvanjem (HE), trikromnim barvanjem po Goldnerju ter s pomočjo imunohistokemičnih metod z uporabo protiteles proti različnim s prolini bogatimi proteini (proteini PRP). Na rezinah tkiv obeh žlez, narezanih na mikrotomu, smo opravili analizo žleznega tkiva, izvodil, velikosti žleznih celic in njihovih jeder na več mikroskopskih poljih na posamezen vzorec, odvisno od meritve. Histološka ocena povečane podušesne slinske žleze (parotidomegalije) je pokazala, da je žleza povečana zaradi povečanih žleznih režnjev, acinusov in površine celic pri prašičih, ki so zauživali T3 krnilo. Značilnih razlik po dodatku protiteles proti bazičnim ali kislim proteinom, bogatimi s prolinom (PRB2 in PRH1/2), nismo opazili. Opazili pa smo tendenco intenzivnosti obarvanja žleznih acinusov s PRB2, ki je bila največja pri skupinah T3 in MT. Pri spodnječeljustni žlezi ni bilo opaznih razlik v izmerjenih in opazovanih parametrih. Študija kaže na to, da je dodatek taninov v prehrani pomemben dejavnik, ki vpliva na histološko zgradbo podušesne slinske žleze.

SUMMARY

Key words: Swine – growth and development; pheromones – adverse effects; dietary supplements – analysis; tannins – analysis; skatol – adverse effects; androsterone – biosynthesis; salivary glands – immunohistochemistry; histological techniques; male

Boar taint is an off-flavour in the meat of entire male pigs and is primarily caused by high levels of androstenone and skatole. Piglets are therefore being surgically castrated without any anaesthesia and analgesia, a practice which is strongly criticised. Due to initiative to abandon this practice in the EU by the year 2018, the alternatives and factors that could reduce boar taint are being investigated. One of them is the effect of nutrition, i.e. specific ingredients such as (tannin). Our goal was to study the effect of hydrolysable tannins in the diet of fattening boars with the focus on its effect on salivary gland morphology. The study was conducted on 29 boars, crosses of Landrace x Large White breeds allocated within litters to five treatment groups: control (T0 fed mixture with 13.2 MJ metabolisable energy ME/kg, 15.6% crude proteins) and experimental diets for which the T0 diet was supplemented with 1% (T1), 2% (T2) and 3% (T3) tannin of hydrolysable tannin-rich extract Farmatan® or 1.5% of microencapsulated form (MT) of Farmatan®. Experiments lasted 10 weeks and pigs were slaughtered at 122 ± 10 kg. Left parotid and mandibular glands were dissected, weighed and stored in the 10% buffered formalin. Tissue samples were stained with haematoxylin-eosin (HE), Goldner's Trichrome method and immunohistochemical methods, using antibodies against different proline rich proteins (PRP). Morphometric analysis was performed on microtome sections of both glands, regarding the acinar area and secretory ductal cells, size of the glandular cells and their nuclei on several microscopic fields per sample, depending on the measurement. The histological assessment revealed parotidomegaly on the basis of larger glandular lobuli, acinar area and bigger acinar cells in pigs receiving T3 diet. No significant differences were observed after addition of basic or acid PRP (PRB or PRH1/2), however tendency toward the highest intensity of colouring of glandular acini was observed in the groups T3 and MT. No statistical differences were observed in the mandibular gland between the groups. This study shows that diet is an important factor in the histological structure in the porcine parotid salivary glands.

KAZALO

POVZETEK	II
SUMMARY	III
KAZALO	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO GRAFI	VIII
KAZALO TABEL	IX
RAZLAGA KRATIC	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED LITERATURE	4
2.1 PROBLEMATIKA VONJA PO MERJASCU	4
2.2 PREHRANSKI VPLIVI NA VONJ PO MERJASCU	5
2.3 TANINI	5
2.4 SLINSKE ŽLEZE	8
2.4.1 Anatomija in histologija podušesne slinske žleze	10
2.4.2 Anatomija in histologija spodnječeljustne slinske žleze	10
2.5 S PROLINOM BOGATI PROTEINI (PROTEINI PRP)	11
2.6 HISTATINI IN DRUGI PROTEINI, KI SO SPOSOBNI VEZAVE TANINOV	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 ŽIVALI	14
3.2 ODVZEM VZORCEV	15
3.3 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV	16
3.4 BARVANJE S HEMATOKSILINOM IN EOZINOM (HE)	17
3.5 TRIKROMNO BARVANJE PO GOLDNERJU	18
3.6 IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE	18
3.6.1 Primarna protitelesa	18
3.6.1.1 PRB2	18
3.6.1.2 PRH1/2	19

3.6.2	Sekundarna protitelesa	19
3.6.3	Postopek imunohistokemičnega barvanja	19
3.7	HISTOMETRIČNA ANALIZA SLINSKIH ŽLEZ	20
3.7.1	Morfometrične analize	20
3.7.2	Meritve intenzivnosti obarvanja imunohistokemične reakcije - optične gostote s parametrom »Sum Density«	22
3.7.3	Statistična obdelava podatkov	22
4	REZULTATI	24
4.1	TEŽA PODUŠESNIH IN SPODNJEČELJUSTNIH SLINSKIH ŽLEZ	24
4.1.1	Razlike v teži slinskih žlez	24
4.1.2	Velikost učinka (Hedgesov koeficient g) pri težah slinskih žlez	26
4.2	VPLIVI TANINOV V PREHRANI NA PITOVNE LASTNOSTI PRAŠIČEV	26
4.3	HISTOLOŠKI PRIKAZ IN PRIKAZ REZULTATOV MORFOMETRIČNE ANALIZE PRI PODUŠESNI SLINSKI ŽLEZI	27
4.3.1	Histološki prikaz podušesne slinske žleze	27
4.3.2	Meritve režnjičev, seroznih acinusov in izvodil pri podušesni slinski žlezi	30
4.3.3	Meritve površine seroznih celic in jeder seroznih celic pri podušesni slinski žlezi ..	33
4.4	HISTOLOŠKI PRIKAZ IN PRIKAZ REZULTATOV MORFOMETRIČNE ANALIZE PRI SPODNJEČELJUSTNI SLINSKI ŽLEZI	34
4.4.1	Histološki prikaz spodnječeljustne slinske žleze	34
4.4.2	Meritve površine in števila mukoznih in mešanih acinusov ter izvodil pri spodnječeljustni slinski žlezi	37
4.4.3	Meritve površine režnjičev pri spodnječeljustni slinski žlezi	41
4.4.4	Meritve površine celic in jeder pri seroznih in mukoznih žlezah spodnječeljustne slinske žleze	42
4.5	IMUNOHISTOKEMIČNE MERITVE PODUŠESNIH SLINSKIH ŽLEZ	45
4.5.1	Imunohistokemično barvanje podušesnih slinskih žlez s protitelesi proti PRB2.....	45
4.5.2	Meritve parametra »Sum density« pri PRB2	47
4.5.3	Imunohistokemično barvanje podušesnih slinskih žlez s protitelesi proti PRH1/2 ..	47
4.5.4	Meritve parametra »Sum density« pri PRH1/2	49
5	RAZPRAVA	50
6	SKLEPI	55

7	ZAHVALE	56
8	LITERATURA	57
9	PRILOGE	61
	PRILOGA I – Pufri in raztopine	61
	PRILOGA II – Kemikalije in oprema	61
	PRILOGA III – Publikacije in prezentacije	62

KAZALO SLIK

Slika 2.1: Kemijska struktura a) galne kisline in b) hidrolizirajočega tanina (galotanina).....	6
Slika 2.2: Shematični prikaz položaja slinskih žlez pri prašiču.....	9
Slika 3.1: Potek raziskovalne naloge.....	23
Slika 4.1: Serozni acinusi podušesne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (HE, 40 x).....	28
Slika 4.2: Serozni acinusi podušesne slinske žleze pri različnih poskusnih Skupinah (trikromno barvanje po Goldnerju, 10 x).....	29
Slika 4.3: Mukozni in mešani acinusi spodnječeljustne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (HE, 10 x).....	35
Slika 4.4: Mukozni in mešani acinusi podjezične slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (trikromno barvanje po Goldnerju, 10 x).....	36
Slika 4.5: Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRB2, 40 x.....	46
Slika 4.6: Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRH ½, 40 x.....	48

KAZALO GRAFOV

Graf 4.1: Vpliv dodatka tanina na težo podušesne ter spodnječeljustne slinske žleze.....	25
Graf 4.2: Vpliv dodatka tanina na površino režnjičev podušesne slinske žleze.....	30
Graf 4.3: Vpliv dodatka tanina na površino in število seroznih acinusov podušesne slinske žleze.....	31
Graf 4.4: Vpliv dodatka tanina na površino žleznih izvodil in število žleznih izvodil/režnjič podušesne slinske žleze.....	32
Graf 4.5: Vpliv dodatka tanina na površino celic seroznih žlez in jeder celic seroznih žlez podušesne slinske žleze.....	33
Graf 4.6: Vpliv dodatka tanina na površino in število mukoznih acinusov spodnječeljustne slinske žleze.....	38
Graf 4.7: Vpliv dodatka tanina na površino in število mešnih acinusov spodnječeljustne slinske žleze.....	39
Graf 4.8: Vpliv dodatka tanina na površino žleznih izvodil in število žleznih izvodil spodnječeljustne slinske žleze.....	40
Graf 4.9: Vpliv dodatka tanina na površino režnjičev spodnječeljustne slinske žleze.....	41
Graf 4.10: Vpliv dodatka tanina na površino celic seroznih celic in površino jeder celic seroznih žlez spodnječeljustne slinske žleze.....	43
Graf 4.11: Vpliv dodatka tanina na površino celic mukoznih žlez in površino jeder celic mukoznih žlez spodnječeljustne slinske žleze.....	44
Graf 4.12: Vpliv dodatka tanina na merjen parameter »sum density« imunohistokemičnega barvanja PRB2 podušesne slinske žleze.....	47
Graf 4.13: Vpliv dodatka tanina na merjen parameter »sum density« imunohistokemičnega barvanja PRH1/2 podušesne slinske žleze.....	49

KAZALO TABEL

Tabela 3.1: Sestava osnovne krmne mešanice (T0).....	15
Tabela 3.2: Struktura vzorcev tkiv za histološko obdelavo.....	16
Tabela 3.3: Izmerjeni parametri na podušesni slinski žlezi.....	21
Tabela 3.4: Izmerjeni parametri na spodnječeljustni slinski žlezi.....	21
Tabela 4.1: Velikost učinka različnih vsebnosti taninov v krmi na težo slinskih žlez pri merjaščkih.....	26
Tabela 4.2: Pitovni rezultati poskusnih merjaščkov	27

RAZLAGA KRATIC

APES	3-aminopropiltrioksilan
APRP	kisli, s prolinom bogati proteini; iz angl. acid proline rich proteins
BPRP	bazični, s prolinom bogati proteini; iz angl. basic proline rich proteins
BSA	goveji serumski albumin; iz angl. bovine serum albumine
DAB	diaminobenzidin
GI	gastrointestinalni
HE	hematoksilin-eozinsko barvanje
ME	metabolna energija
MT	poskusna skupina prašičev z dodatkom 2 odstotkov tanina v krmi v mikroenkapsulirani obliki
OD	optična gostota; iz angl. optical density
EU	Evropska unija
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufru; iz angl. phosphate buffer saline
proteini PRP	s prolinom bogati proteini; iz angl. proline rich proteins
SD	standardna deviacija
SEM	standardna napaka
SS	suha snov
T0	kontrolna skupina prašičev
T1	poskusna skupina prašičev z dodatkom 1 odstotka taninskega ekstrakta v krmi
T2	poskusna skupina prašičev z dodatkom 2 odstotkov taninskega ekstrakta v krmi
T3	poskusna skupina prašičev z dodatkom 3 odstotkov taninskega ekstrakta v krmi

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Merjaščke v rejah, namenjenih pitanju, se (skladno z zakonodajo) kirurško kastrira brez anestezije in analgezije do 7. dneva starosti s ciljem preprečevanja pojava »vonja po merjascu«, ki ga povzročata androstenon in skatol, ki dajeta mesu vonj po urinu in fekalijah. Takšna praksa je vedno manj sprejemljiva in je zaradi poseganja v dobrobit živali predmet številnih kritik. V večini evropskih držav se tako posvečajo številnim raziskavam alternativ za preprečevanje vonja po merjascu. Med možnimi alternativami (kirurška kastracija z anestezijo in analgezijo, metoda seksiranja semena, imunokastracija ali reja merjaščkov) se najbolj uveljavlja reja merjaščkov. Pri reji merjaščkov se študije usmerjajo v preučevanje dejavnikov za zmanjševanje vonja po merjascu. Na vonj vpliva tudi prehrana, saj je tvorba skatola v debelem črevesu odvisna od delovanja mikroorganizmov in razpoložljivosti substrata zanje. Raziskave kažejo, da tanini vplivajo na črevesno mikrofloro, zmanjšajo prebavljinost beljakovin in zmanjšujejo tvorbo skatola v črevesju prašičev. S tem pa predstavljajo potencialno možnost za zmanjšanje vonja po merjascu s pomočjo prehranskih dodatkov. Tanini pa imajo lahko v visokih koncentracijah tudi negativne učinke na organizem, zato so določene živalske vrste proti taninom razvile obrambne mehanizme kot so selektivno prehranjevanje, povečanje slinskih žlez in izločanje proteinov, bogatih s prolinom (proteini PRP), ki se zaradi svoje strukture vežejo na tanine. Prašiči za razliko od drugih vrst domačih živali lahko zaužijejo večje količine taninov, kar dokazuje primer iberijskih prašičev, ki se hranijo z želodom. Vendar pa je v literaturi malo raziskav, ki bi podrobnejše preučile morfološke spremembe, ki se dogajajo pri prašičih. V raziskovalni nalogi za Prešernovo nagrado smo tako raziskovali vpliv različnih koncentracij taninov v krmi na podušesno žlezo slinavko (*gl. parotis*) in spodnječeljustno žlezo slinavko (*gl. mandibularis*). Za proučevanje teh dveh slinskih žlez smo se odločili, ker je podušesna slinska žleza najpomembnejša pri tvorbi in izločanju slino, za spodnječeljustno žlezo pa je še značilno, da sodeluje pri izločanju feromonov (androstenon).

Zanimal nas je vpliv različnih koncentracij taninov na velikost slinskih žlez, spremembe v histološki zgradbi slinskih žlez ter vpliv na vsebnost kislih in bazičnih proteinov PRP v tkivu podušesne slinske žleze.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilj raziskovalne naloge je bil proučiti vpliv dodatka ekstrakta kostanjevega lesa (1, 2 in 3-odstotnega oziroma 1,5-odstotnega mikroenkapsuliranega ekstrakta), bogatega s hidrolizirajočimi tanini na podušesno in spodnječeljustno slinsko žlezo. S pomočjo morfometričnih analiz smo skušali ugotoviti, katere spremembe v strukturi žlez doprinesejo k povečanju skupne mase žlez pri tistih skupinah prašičev, ki so bile krmljene z višjimi koncentracijami taninov. Prav tako smo z imunohistokemičnim barvanjem želeti ugotoviti razlike v prisotnosti proteinov PRP pri različnih poskusnih skupinah.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednji hipotezi:

1. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov ali tanini v mikroenkapsulirani obliki, obstajajo razlike v histometričnih lastnostih podušesne in spodnječeljustne slinske žleze.
2. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov ali tanini v mikroenkapsulirani obliki, obstajajo razlike glede vsebnosti proteinov PRP v podušesni slinski žlezi.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 PROBLEMATIKA VONJA PO MERJASCU

Kirurška kastracija pujskov brez anestezije in analgezije je rutinsko rejsko opravilo, ki se izvaja z namenom preprečevanja neprijetnega vonja mesa, tako imenovanega »vonja po merjascu«. EU zakonodaja dovoljuje kirurško kastracijo brez analgezije v prvih 7 dneh po rojstvu, kasneje pa le z analgezijo in anestezijo (1). Vonj mesa po merjascu se pojavi ob topotni obdelavi mesa spolno zrelih samcev (merjascev) in ga zavrača večina potrošnikov (2). Neprijeten vonj se razvije pri nekastriranih samcih (merjascih) z nastopom spolne zrelosti. Zanj sta odgovorni dve glavni spojini: androstenon (5α -androst-16-ene-3-on) in skatol (3-metil-indol), ki se zaradi svoje lipofilne narave nalagata v maščobnem tkivu.

Androstenon je testikularni steroid, katerega vonj opisujejo kot podoben urinu ter znoju, in je proizvod Leydigovih celic v testisih (3). Skatol, ki ima vonj po fekalijah, nastane kot stranski produkt bakterijske razgradnje aminokisline triptofan v debelem črevesju. Njegov vir so predvsem odmrle celice črevesne sluznice (4), katerih količina pa je odvisna od količine mitoze in apoptoze črevesnega epitelija (5). Dokazano je, da androstenon zavira razgradnjo skatola (6).

Kirurška kastracija merjaščkov brez uporabe anestezije in analgezije je dovoljena do 7. dneva starosti. V zadnjem času je ta praksa predmet številnih kritik z vidika dobrobiti. Obstaja prostovoljna iniciativa ključnih deležnikov po njeni ukinitvi do leta 2018. V večini evropskih držav zaradi napovedanih sprememb v zadnjem času izvajajo raziskave, v katerih se posvečajo preučevanju alternativnih rešitev za preprečevanje vonja po merjascu. Na Nizozemskem, v Belgiji, v zadnjem času pa tudi v Nemčiji in Franciji že prehajajo na rejo merjaščkov (tj. rejo nekastriranih samcev), ki je ena od mogočih alternativ. Ukrepi za zmanjšanje vonja po merjascu so genetske in tehnološke narave (prehrana, higiena in zdravje).

2.2 PREHRANSKI VPLIVI NA VONJ PO MERJASCU

V literaturi lahko zasledimo podatke o vplivu prehrane na zmanjšanje produkcije skatola in s tem zmanjšanje vonja mesa po merjascu (5). Glede vpliva prehrane na raven androstenona, razen posredno preko vpliva na intenzivnost rasti, pa v literaturi ni objavljenih dokazov. Ta je v glavnem povezana s spolnim razvojem, ki je v veliki meri pod vplivom genetskih dejavnikov. Po drugi strani pa je proizvodnja skatola odvisna od delovanja črevesnih mikroorganizmov in razpoložljivosti substrata, na oboje pa lahko vplivamo s prehrano (5), kot je dokazano pri merjaščkih krmljenih z dodatkom inulina, pesnih rezancev, surovega krompirjevega škroba in korenin cikorije (7).

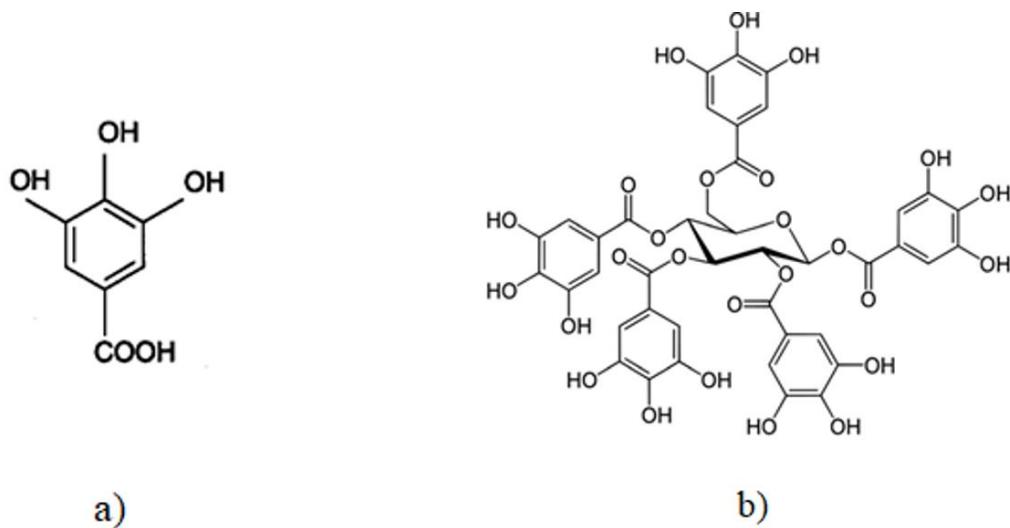
Glede vpliva taninov (vodotopnih polifenolnih spojin, ki jih najdemo pri mnogih vrstah rastlin) na vsebnost skatola v maščobnem tkivu merjascev ne obstaja mnogo literarnih podatkov. V preteklosti so tanine obravnavali kot sekundarne rastlinske metabolite s strogo antinutritivnim učinkom, ki so sposobni precipitirati proteine, zavreti prebavne encime ter resorpcijo vitaminov in mineralov (8). Danes vemo, da lahko zaradi velike strukturne raznolikosti taninov, ki so lahko bodisi hidrolizirajoči ali kondenzirani ter monomerni ali polimerni pričakujemo različne učinke pri različnih vrstah, količinah, odvisno tudi od živalske vrste.

Novejši raziskavi (9, 10) kažeta značilen vpliv višjih koncentracij taninov na zmanjšano produkcijo skatola v črevesju, vendar brez vpliva na količino skatola v maščobnem tkivu. Hkrati pa ti isti raziskavi kažeta na vpliv testiranih koncentracij na vsebnost androstenona in jetrne encime odgovorne za presnovo ksenobiotikov.

2.3 TANINI

Tanini so sekundarni presnovki rastlin. Za rastlino predstavljajo obrambno funkcijo pred rastlinojedimi živalmi, nudijo pa tudi zaščito pred plesnimi in bakterijami (11). Dajejo jim trpek in grenak okus, ki živali odvrne od zauživanja (12). S tanini se v prehrani ljudi in živali zelo pogosto srečujemo. Prisotni so v travah, grmovju, drevesih (v lubju, listju, lesu, koreninah in plodovih) in metuljnicah (medena detelja, lucerna).

Tanini so polifenolne spojine s sposobnostjo precipitacije različnih vrst proteinov. Delimo jih v dve skupini: hidrolizirajoče in kondenzirane tanine. Hidrolizirajoči tanini so estri sladkorja (npr. glukoze) in različnega števila molekul fenolnih kislin (npr. galne kisline ali heksadihidroksidifenske kisline). Struktura variira glede na število molekul galne kisline. Ta vrsta taninov hidrolizira v alkalnem okolju, pri segrevanju pa iz nje nastane pirogalna kislina. Produkta hidrolize sta galna kislina in polihidroksi alkohol. Primer hidrolizirajočih taninov so galotanini, ki se nahajajo tudi v lesu kostanja in so primer estrov galne kisline s taninsko kislino. Kostanj je poleg hrasta, ruja in evkaliptusa najpogostejša drevesna vrsta iz katere pridelujejo komercialne izvlečke hidrolizirajočih taninov (13).



Slika 2.1: Kemijska struktura a) galne kisline in b) hidrolizirajočega tanina (galotanina). Povzeto po (14, 15).

Figure 2.1: Chemical structure of a) gallic acid and b) hydrolysable tannin (gallotannin). Summarized according to (14, 15).

Kondenzirani tanini ali proantocianidi so polimeri flavonolov (flavan-3-ol), ki se med seboj povezujejo z vezmi C-C. V verigi sta lahko najmanj dve molekuli ali pa do 50 flavonolnih molekul. Molekulska masa kondenzirajočih taninov lahko doseže tudi 30.000. Majhne molekule so topne v vodi in organskih topilih, medtem ko so večje molekule netopne. Depolimerizacija poteče v segreti močni kislini (14).

Biološki učinek taninov je lahko ugoden (antimutagen, antikancerogen, antimikroben, antidiareičen, antiparazitaren, antiulkusni) ali škodljiv v večjih količinah (hepatotoksičen, nefrotoksičen, antinutritiven, karcinogen) (8, 11), kar je v veliki meri odvisno od zaužite količine, koncentracije pa tudi od vrste živali. Sprva je veljalo mnenje, da tanini s svojo vezavo na prebavne encime in proteine v hrani delujejo zaviralno (16). Zadnje študije so pokazale, da se tanini ne vežejo na prebavne encime, saj so ti zaščiteni z membransko ovojnico. Zmanjšano prebavlјivost proteinov povzročijo tanini s svojo vezavo na proteine v slini in sluznici črevesja. S tem pride do izgube endogenega dušika in posledično zmanjšane prebavlјivosti proteinov. Poleg tega se lahko fenolna kislina, ki se sprošča pri hidrolizi taninov, preko črevesne sluznice resorbira v kri in povzroča akutno toksičnost v različnih organskih sistemih, kar lahko privede do nekroze ter jetrne in ledvične odpovedi (12).

Živali so proti taninom razvile obrambni mehanizem. Pred zaužitjem taninov se branijo s selektivnim prehranjevanjem. Pri kopitarjih, glodavcih, lagomorfih in primatih je opisano značilno obnašanje, pri katerem se živali izogibajo delom rastlin in vrstam rastlin, ki vsebujejo visoke vrednosti taninov (12). Po zaužitju taninov se živali pred njihovim toksičnim vplivom ščitijo s povečanim izločanjem proteinov PRP, s povečanim izločanjem sluzi v gastrointestinalnem (GI) traktu, mikrobeno razgradnjo taninov v črevesju in aktivacijo detoksikacijskih encimov (12). Podušesna slinska žleza, in v majhni meri tudi spodnječeljustna, sta razvili sposobnost prilagoditve na povečano vsebnost taninov v obroku. Odziv slinskih žlez je tako kvalitativen kot tudi kvantitativen. Podušesna slinska žleza se na povečan vnos taninov odzove s povečanjem svoje velikosti (parotidomegalija) in dvigom ravni izločanja proteinov PRP v slini (12).

Evolucijske strategije preživetja nekaterih živalskih vrst, da bi čim bolje uporabile rastlinske dele za prehrano in se odzvale na povečano vsebnost taninov v krmi, so vodile do prilagoditve na tanine v prehrani s povečanjem izločanja proteinov PRP (11). Ta prilagoditev je najbolj učinkovita pri tistih vrstah, ki so sposobne prilagajati količino proteinov PRP glede na vsebnost taninov v krmi v različnih delih leta in hkrati kaže na prilagodljivost živali na okolje in različne količine taninov. Prašiči spadajo med tiste živalske vrste, ki so sposobne nevtralizirati večje količine taninov v prehrani. Hitro se lahko prilagodijo na prehrano bogato s tanini (17) in so relativno odporni na pirogalno in taninsko kislino (18). Primer so iberijski prašiči v Španiji in na Portugalskem, ki se v tradicionalnih pašnih sistemih hranijo z želodom.

Zato so bili prašiči v več študijah uporabljeni kot poskusni model, ki je sposoben prenašati večje količine taninov (11). Po drugi strani pa so pri nekaterih živalskih vrstah, kot so prežvekovalci, konji in kunci že po manjšem vnosu želoda opazili učinke toksičnosti (11). V prehrani prašičev se dodatek taninov v nizkih koncentracijah uporablja zaradi njihovega antiparazitarnega, antimikrobnega in antivirusnega delovanja ter kot podpora pri zdravljenju driske (19, 20, 21).

V literaturi pa kljub znamenitim podatkom, da prihaja pri povečani koncentraciji taninov v prehrani do sprememb žlez slinavk (npr. parotidomegalija), ne najdemo podrobnejših podatkov o morfoloških spremembah in procesih, ki se dogajajo pri prašičih.

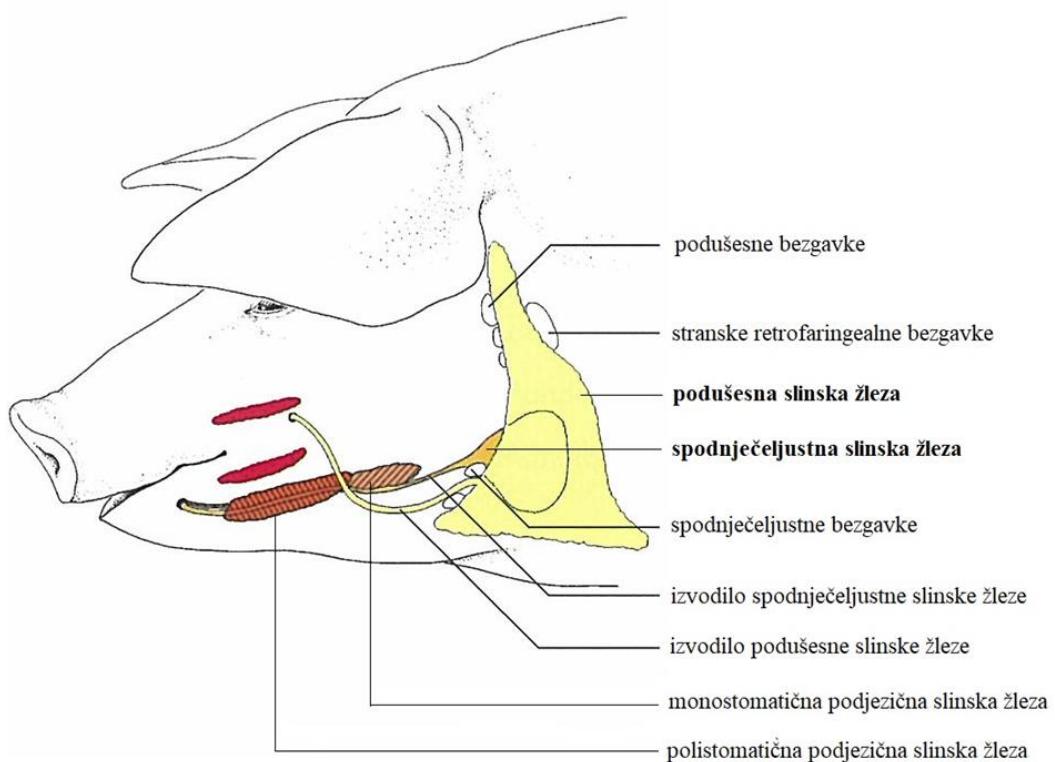
2.4 SLINSKE ŽLEZE

Slinske žleze oz. slinavke so parni organi, ki se nahajajo na področju glave in vratu. Po izvodilih izločajo izloček (slino) v ustno votlino. Delimo jih v dve skupini: manjše slinske žleze ter večje slinske žleze. Med slednje spadajo podušesna slinska žleza (*gl. parotis*), spodnječeljustna slinska žleza (*gl. mandibularis*) in podjezična slinska žleza (*gl. sublingualis*), ki je sestavljena iz dveh žlez: večje podjezične oz. enoodprtinske podjezične žleze (*gl. sublingualis monostomatica*) in manjše oz. večodprtinske žleze (*gl. sublingualis polystomatica*). Manjše slinske žleze, ki izločajo mukozen sekret, se nahajajo v sluznici ustnic, lic, jezika, mehkega neba in jezičnega dna (22, 23).

Žleze slinavke imajo v organizmu vrsto pomembnih fizioloških funkcij. Najpomembnejša je izločanje sline. Glavne sestavine sline so voda, mucin, encima amilaza in ptalin ter soli (22). Slina vlaži sluznico ustne votline in sodeluje pri prebavi hrane. Med žvečenjem mehča hrano in lajša njen prehod po požiralniku, poleg tega pa s svojimi encimskimi izločki sodeluje pri prvih kemičnih prebavnih procesih hrane v ustni votlini. Slina je predvsem pomembna za močenje in mehčanje hrane, da nastane vlažna kašasta zmes, ki jo lažje pogoltnemo. V njej se raztopijo tudi vodotopne sestavine hrane. S tem nastanejo dražljaji za receptorje za okus. Vsebuje tudi antibakterijske encime, kot je npr. lizocim. Na količino in sestavo sline, ki jo izločajo predvsem podušesne žleze slinavke, v manjšem obsegu tudi spodnječeljustne in ostale žleze, ki se razlikujejo glede na živalsko vrsto, lahko vplivajo biološko aktivne

substance v slini. Prašiči dnevno proizvedejo do 15 litrov sline, ki jo večinoma proizvajata podušesna in spodnječeljustna slinska žleza slinavka (24).

Slina se neprestano izloča, količino izločene sline pa uravnata simpatično in parasimpatično živčevje. Parasimpatična oživčenost poteka po V., VII. in IX. kranialnem živcu in vpliva na povečano izločanje sline. Vlakna simpatičnih živcev izvirajo iz kavdalnih prsnih segmentov hrbtenjače, oblikujejo sinapse v kranialnih cervikalnih ganglijih in vstopajo v slinske žleze v tuniki adventiciji arterij. Strah in stres povzročita zmanjšano izločanje sline, dehidracijo in posledično občutek žeje (22). Fenolne substance, ki so naravno prisotne v prehrani, mednje spadajo tanini in njihovi derivati, vplivajo na izločanje proteinov PRP v slini.



Slika 2.2: Shematični prikaz položaja slinskih žlez pri prašiču. Povzeto po (22).

Figure 2.2: Schematic demonstration of porcine salivary glands location. Summarized according to (22).

2.4.1 Anatomija in histologija podušesne slinske žleze

Podušesna slinska žleza je pri prašiču trikotne oblike. Odbana je z maščobnim tkivom in nima izrazite kapsule. Apeks podušesne žleze leži ventralno ob ušesu, anteriorni del sega do žvekalke (*m. masseter*), posteriorni pa do vratne muskulature. Na lateralni strani žlezo pokriva široka kožna mišica vratu (*platysma*). Izvodilo podušesne slinske žleze se odpira na rostralni meji žvekalke. Podušesna žleza je razdeljena na več režnjičev, ki jih ločuje vezivno tkivo, bezgavke in maščobno tkivo (25). Podušesna žleza je serozna žleza. Parenhim sestavlja žlezni acinus, interkalarna, progasta in ekskretorna žlezna izvodila. Acinarne celice so piramidaste do pravokotne oblike in sestavljajo acinuse z majhnim lumnom. Okrogla jedra so pomaknjena na bazalni del celic. Citoplazmo skoraj v celoti zapolnjujejo svetla sekretorna zrnca, ki dajejo celicam vakuoliziran videz. Tri vrste izvodil si sledijo v naslednjem zaporedju: interkalarna, progasta in ekskretorna žlezna izvodila. Interkalarna izvodila povezujejo acinuse s progastimi izvodili. Ločimo dva segmenta interkalarnega izvodila. Prvi segment sestavlja od 4 do 9 celic nizkoprizmatične ali ploščate oblike. V drugem segmentu prevladujejo celice izoprizmatične oblike. Progasta izvodila se na eni strani povezujejo z interkalarnimi, na drugi strani pa s sosednjimi progastimi izvodili, preden se ta izlijejo v ekskretorna izvodila. Sestavlja jih dve vrsti celic: svetle in temne celice. Ekskretorna izvodila se nahajajo v vezivnem tkivu med režnjiči. So večja od drugih dveh vrst in imajo več vezivnega tkiva. Sestavlja jih vrčaste celice, svetle, temne in bazalne celice (25). Skupno izvodilo podušesne žleze se združuje v slinovod, ki se pri prašiču odpira na bradavici podušesne žleze (*papilla parotidea*), ki je v bližini 3–4 zgornjega kočnika (22).

2.4.2 Anatomija in histologija spodnječeljustne slinske žleze

Spodnječeljustna slinska žleza leži blizu čeljustnega kota. Delno jo prekriva podušesna slinska žleza. Izvodilo spodnječeljustne slinske žleze poteka v intermandibularnem prostoru, pod spodnječeljustni-jezično mišico in se odpira v ustno votlino na jezični vezici (26). Je mešana slinska žleza. Acinusi so sestavljeni bodisi iz samih seroznih celic ali pa so v acinusu združene serozne in mukozne celice. Mukozne celice vsebujejo veliko število sekretornih mešičkov. Jedro je tipično pomaknjeno bolj proti bazальнemu delu celice. Mukozne celice

ležijo bližje lumnu acinusa v primerjavi s seroznimi celicami, ki sestavljajo obod acinusa (27).

2.5 S PROLINOM BOGATI PROTEINI (PROTEINI PRP)

Večino proteinov v slini podušesne in pri nekaterih živalskih vrstah tudi spodnječeljustne slinske žleze predstavljajo proteini PRP. Najdemo jih v slini človeka in različnih vrst živali, kot so prašiči, glodavci, lagomorfi, prežvekovalci, psi, mačke, koale in drugi (12, 28). Proteini PRP kažejo na selektivno sposobnost vezave na tanine zaradi fizikalno-kemičnih lastnosti njihove strukture. Vse proteine PRP sestavljajo 4 specifična območja: signalni peptid, prehodno območje, ponovitveno območje in C-terminalni konec (14). V proteinih PRP prevladujejo 4 vrste aminokislin: glicin, glutamin, glutaminska kislina in najbolj zastopana aminokislina – prolin. Vse štiri aminokisline imajo strukturo vijačnice α (12).

Proteine PRP na podlagi njihovega naboja delimo na bazične (iz angl. basic proline rich proteins – BPRP) in kisle (iz angl. acid prolin rich proteins – APRP). Nekateri od njih so lahko tudi fosforilirani ali glikozilirani. Bazični proteini PRP imajo višjo afiniteto do taninov kot kisli, zato naj bi ti predstavljalji glavno obrambo pred tanini v prehrani živali in ljudi (12). Imajo zaščitno vlogo v ustni votlini ter preprečujejo škodo na sluznicah prebavnega trakta, tako da tvorijo taninsko-proteinske precipitate. Kisli proteini PRP vežejo kalcij, pri tem zavirajo nastanek hidroksiapatita in imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju homeostaze kalcija v ustni votlini. Imajo tudi sposobnost močne vezave na hidroksiapatit, ki je glavni mineral v zobeh, in tako pripomorejo k oblikovanju zognega organa. Sklepajo pa tudi na njihovo vlogo pri pritrjevanju mikroorganizmov na površino zoba (28).

Kisli in bazični proteini PRP se razlikujejo tudi glede na lokacijo. V podušesni slinski žlezi najdemo oboje, v spodnječeljustni pa najdemo samo kisle proteine PRP (29).

Sposobnost vezave proteinov PRP s tanini je visoka, tako zavarujejo prebavni trakt pred negativnimi učinki taninov. Literatura opisuje, da je sposobnost vezave kislih in bazičnih proteinov PRP s tanini od 5- do 80-krat večja kot sposobnost vezave govejega serumskega albumina (BSA) in kar 1000-krat višja kot sposobnost vezave lizocima pri prašičih. To omogoča, da proteini PRP delujejo kot prva obrambna linija proti povečanemu vnosu taninov v telo. S tem proteini PRP preprečujejo vezavo taninov z drugimi proteini, kot so recimo

prebavnici ali proteini v sluznici prebavnega trakta. Po vezavi se tvorijo kompleksi tanini-proteini PRP, ki so stabilni v GI traktu in se izločajo s fecesom (12).

Od vseh vrst domačih živali je izločanje proteinov PRP najbolj izrazito pri prašičih. Njihovo povišano izločanje, ko se v krmi pojavi večja količina taninov omogoči, da prašiči lahko takšno krmo uživajo, brez pojavov toksičnih znakov, medtem ko se učinki toksičnosti pri drugih domačih živalih hitro pojavijo. Pri prašičih je izločanje proteinov PRP najbolj intenzivno pri mladih živalih, vendar so tudi pri odraslih opazili hiter in konstanten odziv na povečano vsebnost taninov v obroku z izločanjem proteinov PRP že po 24 urah od spremembe vsebnosti taninov v krmi (11). Pri govedu pa so ugotovili, da se proteini PRP sicer izločajo iz slinskih žlez, vendar nimajo tako velike sposobnosti vezave s tanini (12).

Več študij opisuje vpliv povečanega izločanja proteinov PRP iz podušesne slinske žleze na hipertrofijo žleze ob dodatku taninov (1, 17, 30, 31). Vsebnost proteinov PRP v slini se razlikuje glede na živalsko vrsto. Večje količine bazičnih proteinov PRP so našli v podušesni slinski žlezi pri kuncih, pred tem pa so jih dokazali tudi v njihovi slini. S pomočjo elektronske mikroskopije so pokazali, da se bazični proteini PRP nahajajo v sekretornih granulah seroznih žlez, kjer naj bi bili uniformno razporejeni. Takšno uniformno porazdelitev so opazili tudi pri podganah (28). Za kisle proteine PRP so ugotovili, da se nahajajo pri kuncih v podušesni in tudi podjezični slinski žlezi. Opisali so jih tudi v sero-mukoznih acinarnih celicah (28). Pri različnih vrstah koz so nasprotno ugotovili, da vsebnost taninov v krmi nima bistvenega vpliva na proteine podušesne slinske žleze (32), kar je v nasprotju s pričakovanji, saj normalna sestava krme pri kozah vsebuje veliko taninov. Prav tako so ugotovili, da je sposobnost vezave proteinov v slini podušesne slinske žleze s tanini podobna sposobnosti vezave taninov z BSA. Pri kozah so za odpornost na večjo vsebnost taninov v prehrani zato najverjetneje odgovorni drugi mehanizmi, kot na primer prilagoditev mikroflore v spodnjih delih prebavnega trakta in detoksifikacija v jetrih (32).

2.6 HISTATINI IN DRUGI PROTEINI, KI SO SPOSOBNI VEZAVE TANINOV

Poleg proteinov PRP, imajo pri vezavi s tanini pomembno vlogo tudi histatini. To so majhni proteini z visoko sposobnostjo vezave s hidrolizirajočimi in kondenzirajočimi tanini. Najdemo jih v slini človeka in nekaterih primatov. Zanje je značilna visoka vsebnost histidina, ki predstavlja 25 odstotkov vseh aminokislin (12). V ustni votlini delujejo kot zaščitni mehanizem z antimikrobnim učinkom. Zavirajo tudi nastajanje kristalov hidroksiapatita in s tem vzdržujejo homeostazo na površini sklenine (14). Čeprav imajo histatini visoko sposobnost vezave s tanini, so proteini PRP pomembnejši pri obrambi proti visoki vsebnosti taninov v obroku (12).

Opravljene so bile različne študije, pri katerih so odkrili še druge vrste proteinov s sposobnostjo vezave s tanini. Mole in sod. (33), so ugotovili prisotnost takšnih proteinov v slini laboratorijskih živali, rejnih in divjih živali. Ti proteini imajo 6-krat večjo sposobnost vezave s tanini kot BSA in vsebujejo le 7 odstotkov prolina. Pri govedu so odkrili (34) proteine s 6-krat večjo sposobnostjo vezave s tanini kot z BSA. Njihova vsebnost prolina pa je bila 6,5-odstotna.

Ni znano ali so ti proteini evolucijsko povezani s proteini PRP in histatini. Njihova prisotnost pa nakazuje na evolucijsko prilagoditev teh proteinov in pridobitev sposobnosti vezave s tanini, ter vlogo pri obrambi proti taninom v krmi.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ŽIVALI

Poskus je temeljil na preučevanju vpliva različnih količin (1-3 odstotke) dodanega ekstrakta kostanjevega lesa bogatega s hidrolizirajočimi tanini (preparat Farmatan®, Tanin Sevnica, d. d.) na slinske žleze pri merjaških. Poskus je bil opravljen skladno z zakonodajo o reji in zaščiti živali v običajnih rejskih pogojih. Farmatan® je registriran (dovoljen) krmni dodatek, katerega uporaba ni omejena. Farmatan® je pripravek, kostanjev ekstrakt, ki vsebuje hidrolizirajoče tanine, kemijska analiza, opravljena na Kmetijskem inštitutu Slovenije, pa je pokazala, da je vseboval 43,7-odstotkov skupnih polifenolov, le-teh je bilo pri ekstraktu v mikroenkapsulirani obliki 22-odstotkov.

V poskus je bilo vključenih 29 prašičev, ki so bili razdeljeni v 5 poskusnih skupin: kontrolna skupina (brez dodanih taninov v obroku, T0, n = 6), skupina z 1-odstotnim dodatkom Farmatana v obroku (T1, n = 6), skupina z 2-odstotnim dodatkom Farmatana v obroku (T2, n = 5), skupina s 3-odstotnim dodatkom Farmatana v obroku (T3, n = 6) in skupina z 1,5-odstotnim mikroenkapsuliranim dodatkom Farmatana v obroku (MT, n = 6). Merjaški pasme Landrace x Large White so bili v omenjene skupine razdeljeni pri starosti 123 dni, poskusno pitanje pa je trajalo 70 dni. Kontrolno skupino prašičev smo krmili z običajno mešanico za pitance po recepturi rejca (12,9 MJ ME/kg, 15 odstotkov proteinov, 0,85 odstotkov Lys) (**Tabela 3.1**), medtem ko je bila pri ostalih skupinah v osnovno krmno mešanico dodana še pripadajoča količina taninskega ekstrakta (pri skupini T1 1 odstotek, pri skupini T2 2 odstotka, skupini T3 3 odstotki in skupini MT 1,5 odstotka mikroenkapsuliranega pripravka).

Vsi prašiči so imeli hrano in vodo na voljo ves čas poskusa (*ad libitum*). Težo prašičev smo zabeležili na začetku in na koncu poskusa. Zakol je potekal po standardnem postopku klavnice z uporabo CO₂ za omamljanje (v starosti prašičev 193 dni).

Tabela 3.1: Sestava osnovne krmne mešanice (T0). Povzeto po (9).**Table 3.1: Composition of feed mixture.** From Čandek-Potokar et al. 2015 (9).**Sestava [%]**

koruza	62,0
sojine tropine	13,0
pšenično krmilo	8,0
repične tropine	7,0
sončnične tropine	5,0
melasa	2,0
kalcijev karbonat	1,1
lizin	1,0
metionin	0,3
monokalcijev fosfat	0,17

Kemijska zgradba

SS [§] [g/kg]	892,5
surove beljakovine [g/kg SS]	174,5
etrov ekstrakt [g/kg SS]	25,9
surova vlaknina [g/kg SS]	51,5
surovi pepel [g/kg SS]	47,6
ME [□] [MJ/kg]	13,2

Legenda: *Kot dodatek smo uporabili Farmatan, kostanjev ekstrakt z visoko vsebnostjo hidrolizirajočih taninov;

[§]SS, suha snov; [□]ME, metabolna energija

3.2 ODVZEM VZORCEV

Po zakolu so bili pri vseh prašičih odvzeti vzorci levih podušensnih žlez slinavk in levih spodnječeljustnih žlez slinavk. Vzorci so bili shranjeni v 10-odstoten puferiran formalin. Skupno število pregledanih vzorcev je povzeto v **Tabeli 3.2**. V nekaterih skupinah je bilo pregledano manjše število vzorcev, kot je razvidno iz **Tabele 3.2** zaradi materiala žlez, ki ni bil primeren za nadaljnjo obdelavo.

Tabela 3.2: Struktura vzorcev tkiv za histološko obdelavo.**Table 3.2: Structure of tissue samples for histological evaluation.**

Skupina	Lastnosti skupine	n	Odvzeti vzorci	Št. histoloških preparatov (HE barvanje + trikromno barvanje po Goldnerju)	Št. histoloških imunohistokemično pobarvanih preparatov (PRB2 + PRH1/2)
T0	standardna krmna mešanica	6	podušesna slinska žleza spodnječeljustna slinska žleza	5 + 5 6 + 6	5 + 5
T1	standardna krmna mešanica, 1-odstotni dodatek taninov	6	podušesna slinska žleza spodnječeljustna slinska žleza	4 + 4 5 + 5	4 + 4
T2	standardna krmna mešanica, 2-odstotni dodatek taninov	5	podušesna slinska žleza spodnječeljustna slinska žleza	4 + 4 5 + 5	4 + 4
T3	standardna krmna mešanica, 3-odstotni dodatek taninov	6	podušesna slinska žleza spodnječeljustna slinska žleza	6 + 6 6 + 6	6 + 6
MT	standardna krmna mešanica, 1,5-odstotni mikroenkapsulirani tanini	6	podušesna slinska žleza spodnječeljustna slinska žleza	5 + 5 5 + 5	5 + 5
SKUPAJ				102	48

Legenda: T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanicą; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; T4: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

3.3 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV

Odvzeti vzorci slinskih žlez so bili fiksirani v 10-odstotni raztopini formalina. Vzorce smo pred nadaljnjam delom zmanjšali in ustrezno preoblikovali ter jih po utečenem postopku zalili v parafin. Uporabili smo aparaturo Leica TP1020. Predhodno smo predmetna stekla, premazali z raztopino APES, da bi zagotovili obstojnost histoloških rezin na steklu. Stekla smo oprali v močnem detergentu, jih sprali z vodo in nato posušili v termostatu (50 °C). Stekla smo nato prestavili v 2-odstotno raztopino APES (3-aminopropiltrioksilan) v acetonu (30 sekund), jih posušili, nato ponovno prestavili v 2-odstotni APES v acetonu (30 sekund),

odcedili, sprali, zopet odcedili, nato pa posušili. Za 30 sekund smo jih nato prestavili v aceton, jih posušili, sprali z vodo in jih čez noč postavili v termostat (50°C).

Za rezanje vzorcev v parafinu smo uporabili ročni mikrotom Leica SM2000R. Rezine debeline $5\ \mu\text{m}$ smo prenesli v kadičko s toplo vodo, jih na vodni gladini raztegnili in ujeli na predmetna stekla. Predmetnice smo nato postavili v termostat (50°C), da so se posušile in jih potem uporabili za hematoksilin-eozinsko barvanje (HE), trikromno barvanje po Goldnerju ter imunohistokemično barvanje za bazične proteine PRP (PRB2) in kisle proteine PRP (PRH1/2).

3.4 BARVANJE S HEMATOKSILINOM IN EOZINOM (HE)

Protokol barvanja smo pričeli z deparafinizacijo v raztopini Neoclear (2×5 minut), nato pa nadaljevali s postopno rehidracijo v etilnem alkoholu (100-odstotna koncentracija 2×5 minut, 96-odstotna 5 minut, 70-odstotna 5 minut) in spiranjem v destilirani vodi (5 minut). Vzorce smo nato za 1 minuto prenesli v barvilo hematoksilin in jih takoj za tem spirali s tekočo vodo (15 minut). Po spiranju smo nadaljevali barvanje z barvilm eozin (1–2 minuti), ki mu je sledilo spiranje z destilirano vodo (5 minut oz. glede na stopnjo obarvanja, ki smo ga sproti ocenjevali pod mikroskopom). Barvanje smo zaključili z dehidracijo vzorcev v naraščajočih koncentracijah etilnega alkohola (70-odstotna koncentracija 5 minut oz. glede na stopnjo obarvanja, ki smo jo sproti ocenjevali pod mikroskopom; 96-odstotna 5 minut, 100-odstotna 2×5 minut). Za bistrenje vzorcev po končanem postopku barvanja smo uporabili raztopino Neoclear (Sigma) (nadomestek ksilola) (3×5 minut). Na predmetnice smo pred pokrivanjem s pokrovnim stekelcem nanesli kapljico smole Neomount (Merck Milipore) in jih nato posušili na zraku (30 minut).

3.5 TRIKROMNO BARVANJE PO GOLDNERJU

Barvanje smo začeli z deparafinizacijo v raztopini Neoclear (Sigma) (2 x 5 minut) in nadaljevali z rehidracijo v etilnem alkoholu (100-odstotna koncentracija 2 x 5 minut, 96-odstotna 5 minut, 70-odstotna 5 minut), nato pa spirali v destilirani vodi (5 minut). Sledilo je barvanje z železovim hematoksilinom (2 minuti) in spiranje s tekočo vodo (10 minut), nato pa spiranje z 1-odstotno ocetno kislino (30 sekund), barvanje z raztopino Red 2G (10 sekund), ponovno spiranje z 1-odstotno ocetno kislino (30 sekund), barvanje s fosfovolframovo kislino z barvilm Orange G (1 minuta), spiranje v 1-odstotni ocetni kislini (30 sekund), barvanje v barvilu light green SF (2 minuti) in končno spiranje v 1-odstotni ocetni kislini (30 sekund). Vzorce smo v naraščajočih koncentracijah etilnega alkohola postopno dehidrirali (70-odstotna koncentracija 5 minut, 96-odstotna 5 minut, 100-odstotna 2 x 5 minut) in jih nato prenesli v raztopino Neoclear (3 x 5 minut), ki se uporablja za končno čiščenje vzorcev po barvanju. Na predmetnice smo nanesli smolo Neomount (Merck Milipore), ki se uporablja kot reagent proti zbleditvi, in jih pokrili s pokrovnim stekelcem. Vzorce smo posušili na zraku (30 minut) in jih shranili v temen prostor.

3.6 IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE

Pri imunohistokemičnem barvanju smo uporabili puferirano fiziološko raztopino v fosfatnem pufru (PBS) in natrijev citratni pufer, primarna protitelesa (PRB2 in PRH1/2) in sekundarna protitelesa.

3.6.1 Primarna protitelesa

3.6.1.1 PRB2

Protitelesa proti PRB2 so protitelesa, ki se uporabljam za označevanje in dokazovanje bazičnih proteinov (PRB2) z različnimi postopki, kot so imunohistokemija, western blot, pretočna citometrija, imunofluorescanca. Uporabili smo poliklonska kunčja protitelesa proti C-terminalnem koncu humanega PRB2 (anti-PRB2, kataloška oznaka: WA-AP5480b) (Abgent). Uporabili smo razredčitev 1 : 100 v PBS po opisanem postopku (35).

3.6.1.2 PRH1/2

Protitelesa proti PRH1/2 so protitelesa proti kislim proteinom PRH1 in PRH2. Uporabili smo kozja in kunčja protitelesa proti N-terminalnem koncu humanega PRH1/2 (anti-PRH1/2; kataloška oznaka: sc-169030) (Santa Cruz Biotechnology) in razredčitev 1 : 25 v PBS po opisanem postopku (35).

3.6.2 Sekundarna protitelesa

Kot sekundarna protitelesa smo uporabili proti mišja/kunčja protitelesa (Dako REAL™ EnVision™), ki so vezana na avidin-biotinski kompleks/hrenova peroksidaza (iz. angl. ABC – Avidin biotin complex/horseradish peroxidase). Za vizualizacijo reakcije smo uporabili reakcijo peroksidaza-3-diaminobenzidin (DAB) (Envision™ Detection System, Dako).

3.6.3 Postopek imunohistokemičnega barvanja

Postopek imunohistokemičnega barvanja smo začeli z deparafinizacijo v raztopini Neoclear (2 x 5 minut), nato pa nadaljevali s postopno rehidracijo v etilnem alkoholu (100-odstotna koncentracija 2 x 5 minut, 96-odstotna 5 minut, 70-odstotna 5 minut) in spiranje v destilirani vodi (5 minut). Ker lahko nekateri antigeni postanejo prepoznavni samo po predhodni pripravi tkiva, smo najprej izvedli postopek demaskiranja antigenov. Predmetnice smo postavili v kadičko z Na-citratnim pufrom (pH = 6,0), jih pokrili s pokrovom in za 10 minut postavili v mikrovalovno pečico (Whirlpool Talent Compact), moč pečice pa smo nastavili na 650W. Med segrevanjem smo nadzirali raven pufra v kadički in ga po potrebi dodajali s pomočjo injekcijske igle in brizge, da bi preprečili izsušitev vzorcev. Predmetnice smo nekoliko ohladili. Sledila je inhibicija endogene peroksidaze, ki onemogoči nespecifično vezavo protiteles na peroksidazo, ki je sestavni del tkiv. Predmetnice smo obrisali s spodnje strani in okoli rezin, nato pa na rezine nakapali raztopino. Predmetnice smo položili v vlažno komoro, ki je onemogočala izsušitev, in jih 20 minut inkubirali na sobni temperaturi. Predmetnice smo po inkubaciji kratko spirali z destilirano vodo, nato pa za 5 minut prenesli v izpiralni pufer (PBS). Predmetnice smo ponovo obrisali s spodnje strani in okoli rezin ter na rezine nanesli primarna protitelesa (anti PRB2, razredčitev 1 : 100; PRH1/2, razredčitev 1 :

25). Predmetnice smo postavili v vlažno komoro in jih čez noč inkubirali pri 4°C. Rezine smo naslednji dan kratko sprali s PBS-pufrom in jih nato še za 5 minut prestavili v kadičko z izpiralnim pufrom (PBS). Po spiranju smo predmetnice obrisali s papirnato brisačo in na rezine nanesli sekundarna protitelesa (ABC/HRP kompleks), jih prenesli v vlažno komoro in 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Spet je sledilo kratko spiranje z izpiralnim pufrom (PBS) in prenos v izpiralni pufer (PBS, 5 minut). Za vizualizacijo produkta smo uporabili raztopino DAB (kataloška številka K5007), ki smo jo nanesli na rezine in 2 minuti inkubirali. Nato smo predmetnice prenesli v kadičko z vodo in 5 minut spirali. Barvanje smo zaključili z dehidracijo v naraščajočih koncentracijah alkohola (70-odstotna koncentracija 5 minut, 96-odstotna 5 minut, 100-odstotna 2 x 5 minut), nato pa prenesli v raztopino Neoclear (3 x 5 minut). Nanje smo nanesli smolo (Neomount) in jih pokrili s pokrovnim stekelcem. Vzorce smo posušili in jih pred pregledovanjem pod mikroskopom shranili v temnem prostoru.

3.7 HISTOMETRIČNA ANALIZA SLINSKIH ŽLEZ

3.7.1 Morfometrične analize

Za morfometrične analize podušesne in podjezične žleze slinavke smo uporabili preparate, pobarvane s trikromnim barvanjem po Goldnerju. Meritve smo opravili na mikroskopu (Nikon FXA). Slika opazovanega mikroskopskega objekta je bila zajeta z vgrajeno kamero Nikon DS-F1 in samodejno prenesena v računalniški program za analizo slike Lucia-G (Nikon). Slikanje in meritve so bile opravljene pri istih pogojih in osvetlitvi. Vse poskusne skupine so bile zastopane v vseh serijah meritev s ciljem, da ne bi prišlo do vpliva pogojev merjenja na skupino. Na podušesni žlezi smo izmerili parametre, ki so navedeni v **Tabeli 3.3**. Na spodnječeljustni žlezi pa smo opravili meritve, ki so navedene v **Tabeli 3.4**.

Rezultate meritev smo prikazali v dveh skupinah grafov. V prvi skupini grafov so prikazane meritve skupin z različni količinami dodatka Farmatana v obroku v primerjavi s kontrolno skupino. V drugi skupini pa skupina, ki je prejela mikroenkapsuliran Farmatan v primerjavi s kontrolno skupino brez dodatka Farmatana. Pri vseh skupinah prašičev smo uporabili enotni statistični test (opisano v poglavju 3.7.4), zaradi raznolikosti sestave krmnega dodatka pa smo jih prikazali ločeno.

Tabela 3.3: Izmerjeni parametri na podušesni slinski žlezi.**Table 3.3: Measured parameters on parotid gland.**

Izmerjen parameter	Povečava	Število meritev
površina acinusov	400	30 acinusov
število acinusov	200	8 vidnih polj
površina izvodil	200	20 izvodil
število izvodil		vsa izvodila na 8 različnih, naključno izbranih režnjičih
površina režnjičev	20	vsi režnjiči na preparatu
površina jeder	400	20 jeder
površina seroznih celic	400	20 celic

Tabela 3.4: Izmerjeni parametri na spodnječeljustni slinski žlezi.**Table 3.4: Measured parameters on mandibular gland.**

izmerjen parameter	povečava	število meritev
površina mukoznih acinusov	400	30 acinusov
število mukoznih acinusov	200	8 vidnih polj
površina mešanih acinusov	400	30 acinusov
število mešanih acinusov	200	8 vidnih polj
površina žleznih izvodil	200	20 izvodil
število žleznih izvodil	100	8 vidnih polj
površina režnjičev	20	vsi režnjiči na preparatu
površina jeder celic seroznih žlez	400	20 jeder
površina celic seroznih žlez	400	20 celic
površina jeder celic mukoznih žlez	400	20 jeder
površina celic mukoznih žlez	400	20 celic

3.7.2 Meritve intenzivnosti obarvanja imunohistokemične reakcije - optične gostote s parametrom »Sum Density«

Vzorce iz različnih skupin (predstavljene v **Tabeli 3.2**) smo imunohistokemično obarvali z namenom, da bi primerjali vsebnost kislih (PRH1/2) in bazičnih proteinov PRP (PRB2) v tkivu žlez. Obarvanim vzorcem smo ob standardni osvetljavi izmerili intenzivnost obarvanja z določanjem parametra »Sum Density«. Ta predstavlja vsoto izmerjenih optičnih gostot (OD, iz angl. optical density) vseh pikslov v področju opravljenih meritev. Večja OD izraža večjo količino substance na nekem področju. Ocenujemo jo s pomočjo spodnje enačbe.

$$\text{OD} = -\log \frac{(\text{Pixel Intensity Value} + 0.5)}{62.5}$$

Parameter »Sum Density« smo izmerili na področju $15 \mu\text{m}^2$ površine citoplazme celic. Za meritev smo naključno izbrali 10 mest na vidnem polju in 10 različnih vidnih polj, pri 40-kratni povečavi. Za vsako žlezo smo tako pridobili 100 podatkov, katerih povprečje smo upoštevali za primerjavo razlik med skupinami. Meritve smo opravili na mikroskopu (Nikon FXA), slikali pa s pomočjo kamere Nikon DS-F1. Za analizo slik smo uporabili računalniški program za analizo slike Lucia-G.

3.7.3 Statistična obdelava podatkov

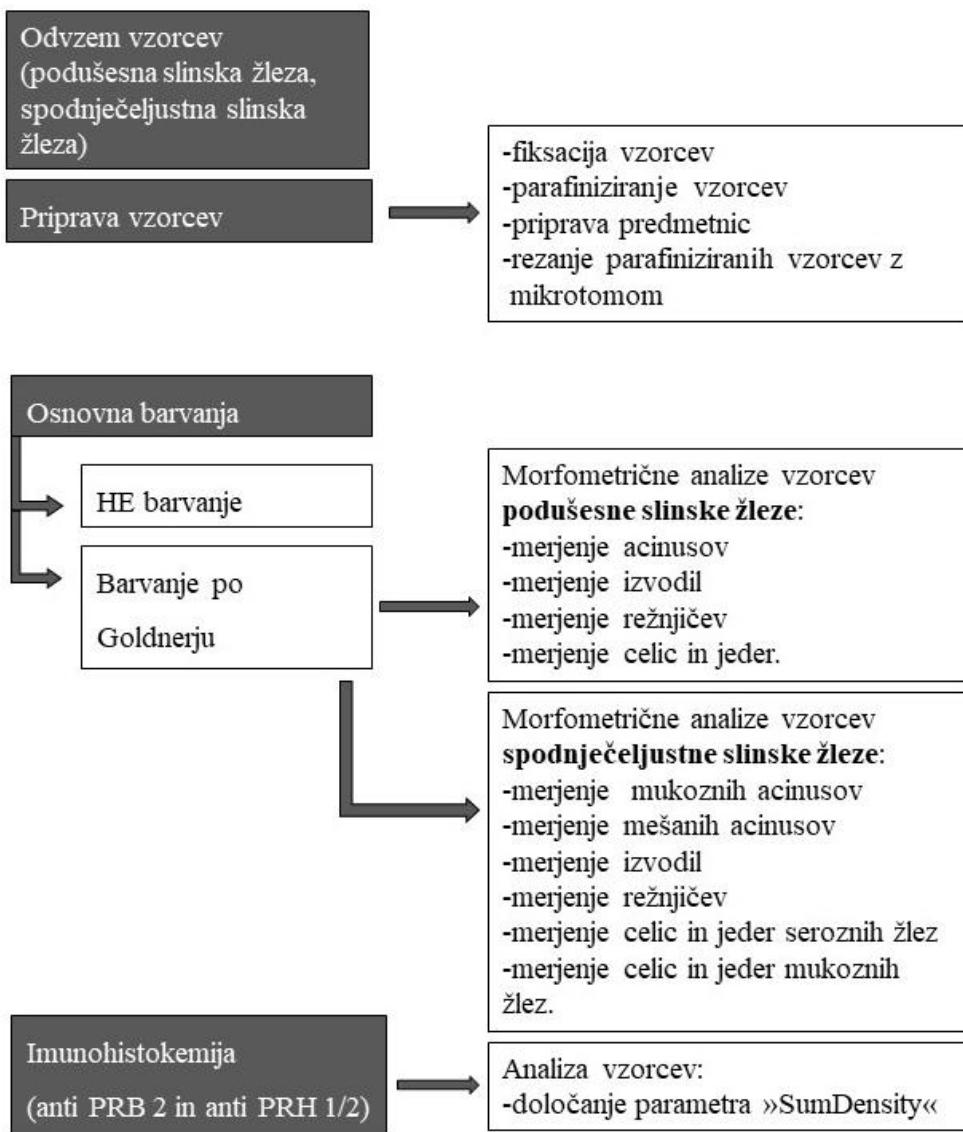
Rezultate analiz smo statistično obdelali s programom Graph Pad Prism, različica 3.2. Podatki so prikazani na grafih. Srednje vrednosti so navedene kot povprečje (aritmetična sredina) s standardno napako (SEM). Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami prašičev smo uporabili enosmerni statistični test analize variance (ANOVA). Za statistično značilnost vpliva je bila upoštevana vrednost $P < 0,05$. Za primerjavo med poskusnimi skupinami prašičev smo uporabili neparni t-test. V primeru statistično značilnih razlik med poskusnimi skupinami smo le-te na grafih označili z različnimi črkami.

Za nekatere meritve smo izračunali Hedgesov koeficient g, s katerim smo ugotavljali velikost učinka, ki omogoča dopolnilno testiranje statistične pomembnosti razlik ter primerjavo velikosti učinka za različne parametre. Večja kot je absolutna vrednost, večji je učinek; vrednosti nad 0,8 pa predstavljajo že zelo velike učinke.

Izračunamo ga tako, da razliko aritmetičnih sredin primerjanih skupin (kontrolne skupine T0 proti poskusni skupini) delimo s skupno (združeno) standardno deviacijo (SD) obeh ter pomnožimo s predpisanim faktorjem.

$$g = \frac{(M_1 - M_2)}{SD} \times \left(1 - \frac{3}{4 \times (n_1 + n_2 - 9)} \right)$$

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times SD_1 + (n_2 - 1) \times SD_2}{n_1 + n_2 - 2}}$$



Slika 3.1: Potek raziskovalne naloge.

Figure 3.1: Course of research work.

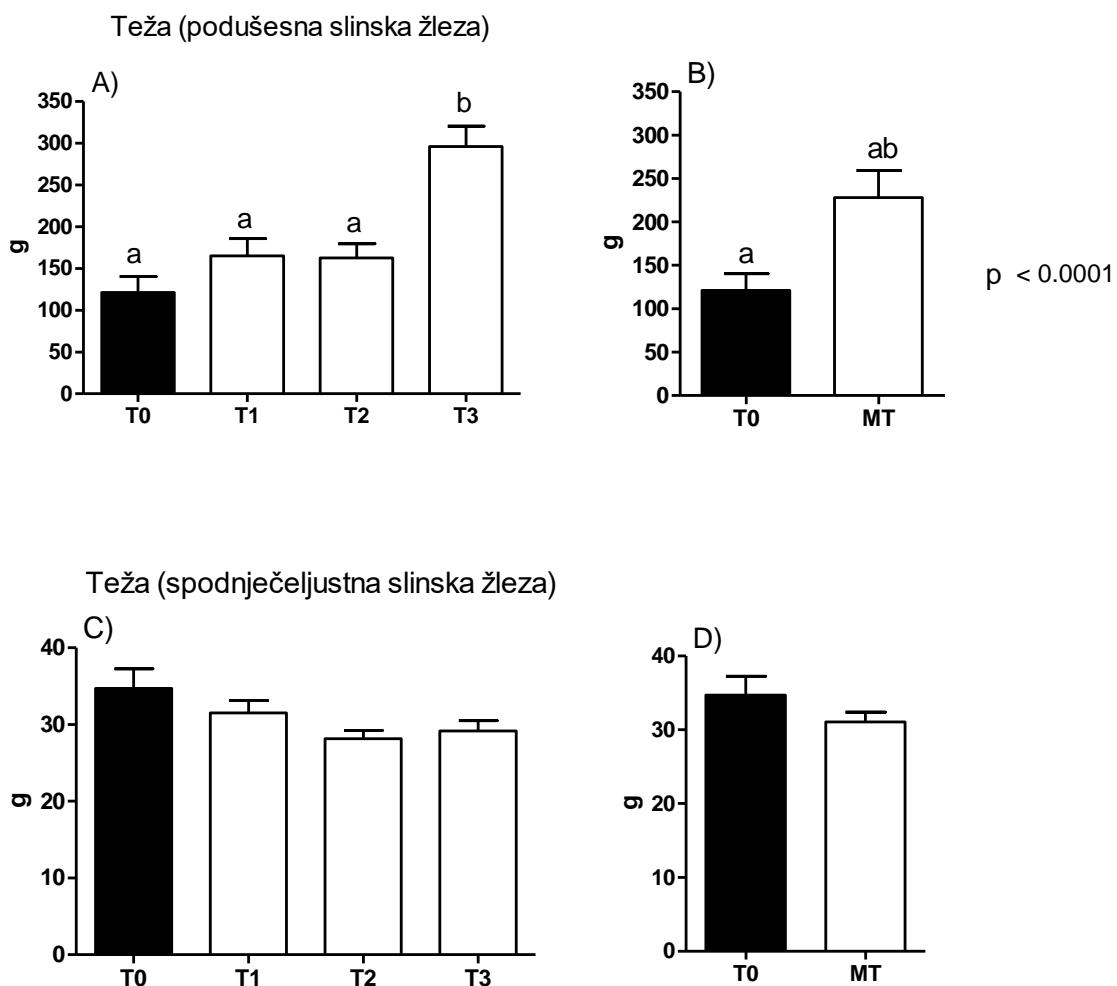
4 REZULTATI

4.1 TEŽA PODUŠESNIH IN SPODNJEČELJUSTNIH SLINSKIH ŽLEZ

4.1.1 Razlike v teži slinskih žlez

Vpliv različnih količin taninov v krmi je pokazal razlike med poskusnimi skupinami prašičev v teži slinskih žlez, predvsem podušesne slinavke (**Graf 4.1**) (povzeto po 9). Dodani so podatki za skupino prašičev, ki je dobivala v krmi 1,5-odstotni delež taninov v mikroenkapsulirani obliki (MT).

Dodatek tanina je imel značilen vpliv na težo podušesne slinske žleze ($P < 0,0001$) (**Graf 4.1 A in B**) in je nakazoval zmanjšanje teže spodnječeljustne slinske žleze ($P = 0,082$) (**Graf 4.1 C in D**). V primerjavi s prašiči v skupini T0, so imeli prašiči v poskusnih skupinah T1 in T2 1,2-krat težjo podušesno slinsko žlezo ($P > 0,10$), medtem, ko so imeli prašiči v poskusni skupini T3 2,5-krat težjo podušesno slinsko žlezo ($P < 0,0001$) v primerjavi s kontrolno skupino T0. Pri skupini prašičev, ki so prejeli mikroenkapsulirano obliko taninov (MT) je bila teža podušesnih slinskih žlez povišana za 1,8-krat, teža spodnječeljustne slinske žleze pa je bila primerljiva s skupino T3, in sicer je bila zmanjšana za 15,9 odstotka in 10,5 odstotka pri skupini T3 in MT v primerjavi s kontrolno skupino.



Graf 4.1: Vpliv dodatka tanina na težo podušesne ter spodnječeljustne slinske žleze. T0 : kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata težo podušesne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah, C) in D) težo spodnječeljustnih slinskih žlez pri različnih poskusnih skupinah; ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

Graph 4.1: Influence of the tannin supplementation on the weights of the parotid and mandibular salivary glands. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) represent the weight of the parotid glands in different experimental groups, C) and D) represent the weight of the mandibular glands in different experimental groups; ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.

4.1.2 Velikost učinka (Hedgesov koeficient g) pri težah slinskih žlez

Za ugotavljanje praktične pomembnosti razlik v teži podušesne in spodnječeljustne slinske žleze smo izračunali Hedgesov koeficient g in pridobili podatke o velikosti učinka posameznih koncentracij taninov na preučevani slinski žlezi (**Tabela 4.1**). Velikost učinka je bila pri podušesni slinski žlezi med 0,8 in 3,0, največji učinek je bil pri skupinah T3 in MT. Kljub temu, da je bil vpliv dodatka taninov na spodnječeljustno slinsko žlezo statistično manj značilen (le tendenca, $P = 0.082$) in velikost učinka manjša (med 0,6 in 1,3), pa ta vrednost še vedno predstavlja velik učinek (na zmanjšanje teže), ki je bil najbolj izražen pri skupinah T2 in T3.

Tabela 4.1: Velikost učinka različnih vsebnosti taninov v krmi na težo slinskih žlez pri merjaščkih.

Table 4.1: Effect size of supplementing a diet with tannin-rich extract on the salivary glands weights of entire male fatteners.

	Podušesna slinska žleza (Hedges g)	Spodnječeljustna slinska žleza (Hedges g)
T1	0,8	-0,6
T2	0,9	-1,3
T3	3,0	-1,0
MT	1,5	-0,7

4.2 VPLIVI TANINOV V PREHRANI NA PITOVNE LASTNOSTI PRAŠIČEV

V predhodno opravljeni raziskavi (9) so ugotavljali razlike med poskusnimi skupinami prašičev glede pitovnih lastnosti (**Tabela 4.2**), in sicer je bil vpliv (manjša konzumacija in posledično prirast) značilen pri skupini z največjim, 3-odstotnim dodatkom taninov (9). V omenjeni raziskavi (9) pa skupina MT ni bila obravnavana. Zato smo naredili dodatno preveritev (neparni t-test) samo za to skupino, ki je pokazala, da je bila skupina MT v dnevni konzumaciji krme podobna T1 in T2 (**Tabela 4.2**), kar je skladno s tem, da je bila podobna tudi koncentracija taninov; se pa ni statistično značilno razlikovala niti od T3.

Tabela 4.2: Pitovni rezultati poskusnih merjaščkov. Povzeto po Čandek-Potokar s sod., 2015 (9) z dodanimi rezultati za skupino MT.

Table 4.2. Performance of experimental pigs. From Čandek-Potokar et al., 2015 (9) with added results for MT group experimental group.

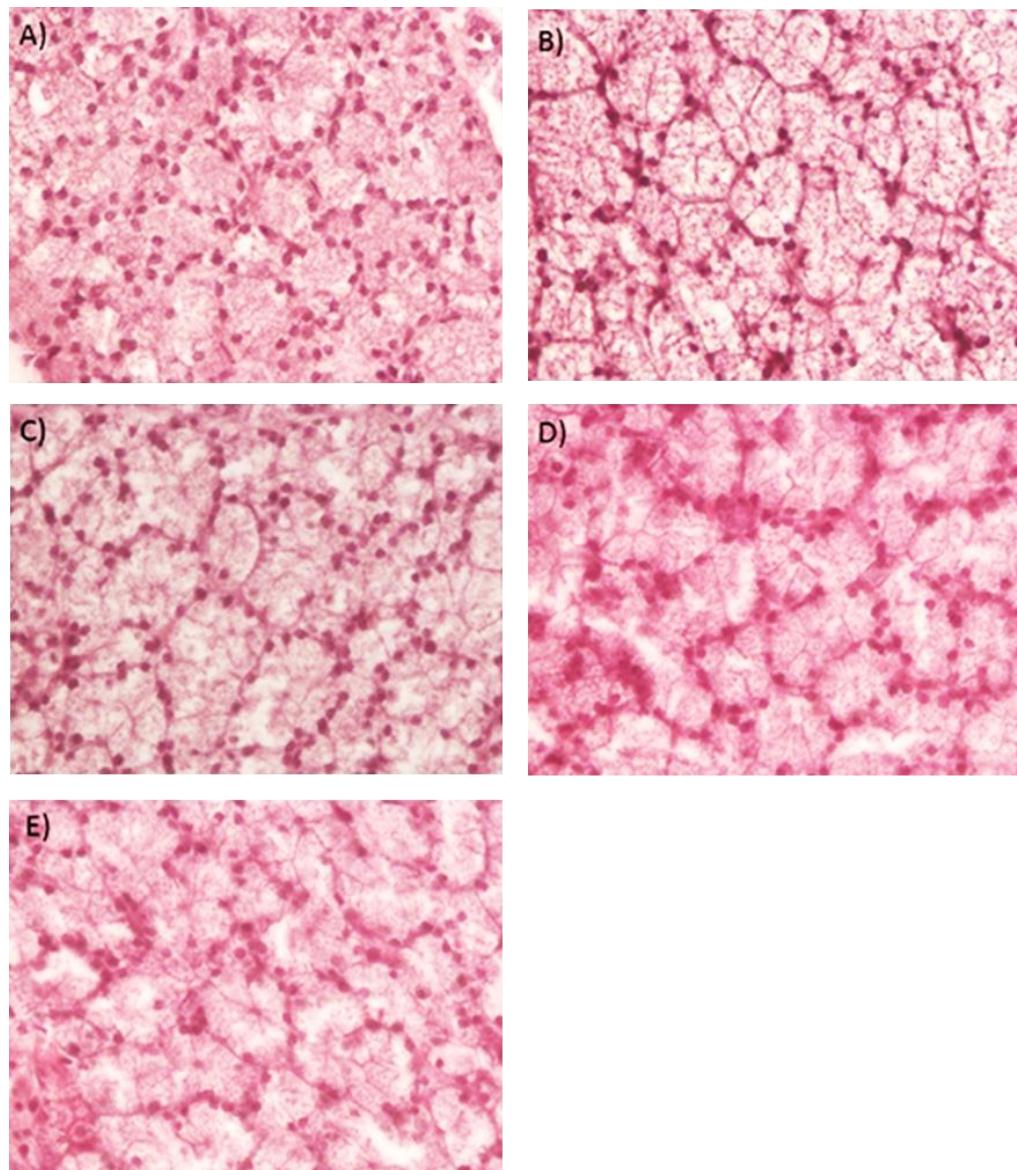
	T0	T1	T2	T3	MT
Končna teža (kg)	124,3	124,7	125,6	115,5	122,7
Dnevni prirast (kg)	1,065	1,073	1,076	0,940	1,032
Konzumacija krme (kg/dan)	2,95	2,79	2,98	2,50	2,83
Konverzija krme (kg/kg prirasta)	2,77	2,61	2,76	2,67	2,74

Legenda: T0: kontrolna skupina, krmiljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; T4: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

4.3 HISTOLOŠKI PRIKAZ IN PRIKAZ REZULTATOV MORFOMETRIČNE ANALIZE PRI PODUŠESNI SLINSKI ŽLEZI

4.3.1 Histološki prikaz podušesne slinske žleze

Histološka zgradba podušesne slinske žleze je ustrezala značilni zgradbi, ki jo poznamo pri prašičih (25) (**Slika 4.1**). Pri nekaterih vzorcih smo mestoma opazili infiltrate limfocitov, krvavitve in prisotnost maščobnega tkiva v večji meri kot je to normalno. Na preparatih, obarvanih s trikromnim barvanjem po Goldnerju, smo zaradi zelene obarvanosti vezivnega tkiva bolj očitno opazili velikost režnjev in žleznih acinusov. Med opazovanimi skupinami nismo zaznali očitnejših razlik v količini vezivnega tkiva (**Slika 4.2**).



Slika 4.1: Serozni acinusi podušesne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (HE, 40 x). A) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; B) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; C) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; D) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; E) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.1: Serous acini of parotid gland in different experimental groups (HE, 40 x). A) T0: Control group, fed a standard mixture; B) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; C) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; E) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.



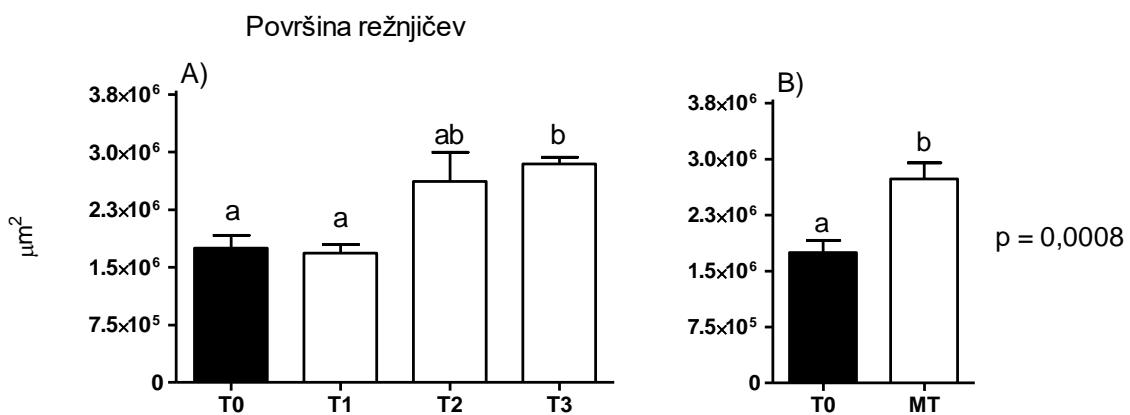
Slika 4.2: Serozni acinusi podušesne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (trikromno barvanje po Goldnerju, 10 x). A) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; B) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; C) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; D) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; E) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.2: Serous acini of parotid gland in different experimental groups (trichrome Goldner's Trichrome method, 10 x). A) T0: Control group, fed a standard mixture; B) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; C) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; E) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.

4.3.2 Meritve režnjičev, seroznih acinusov in izvodil pri podušesni slinski žlezi

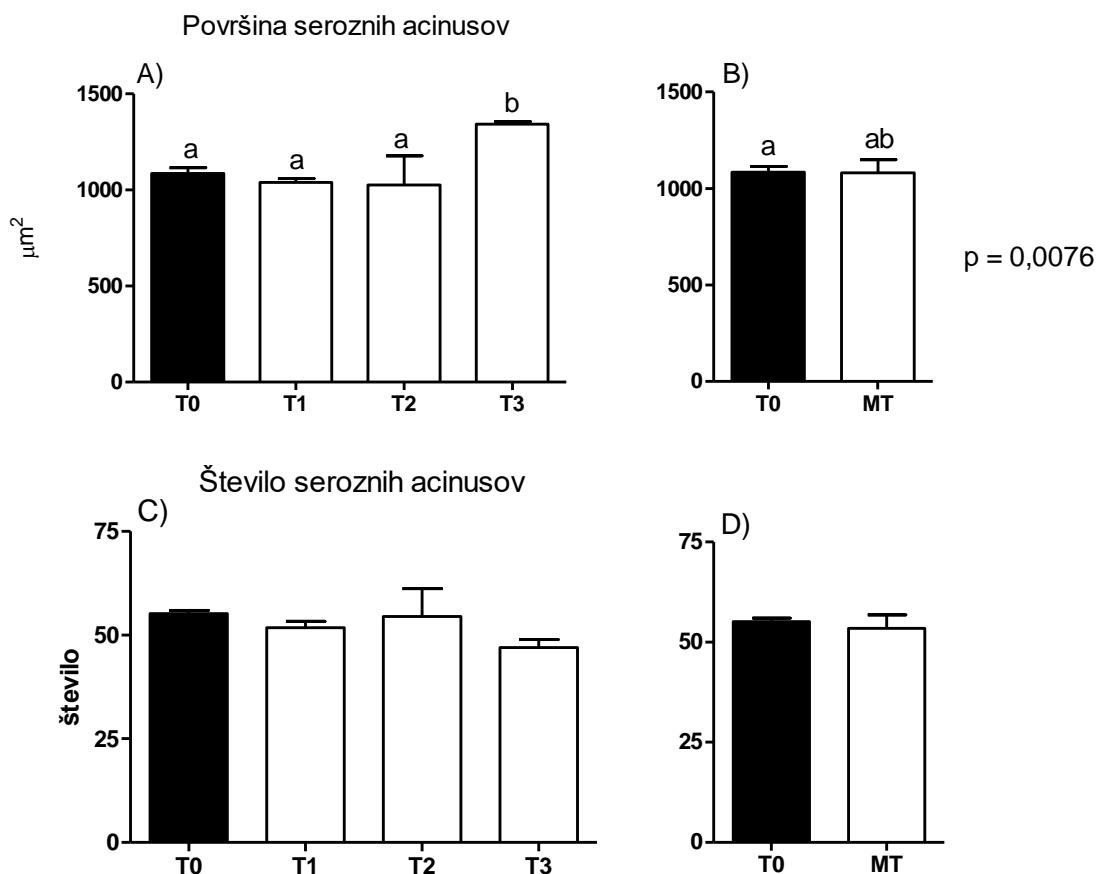
Na **Grafu 4.2, 4.3 in 4.4** so zbrane meritve površine režnjičev, površine seroznih acinusov, števila seroznih acinusov ter površine in števila izvodil podušesne slinske žleze pri štirih poskusnih skupinah (T1, T2, T3 in MT), v primerjavi s kontrolno skupino (T0).

Pri meritvah površine režnjičev, površine seroznih acinusov, ter števila žleznih izvodil na režnjič smo ugotovili značilen vpliv dodatka taninov v obroku. Površina režnjičev je bila značilno povečana pri skupinah T3 in MT. Površina seroznih acinusov se je razlikovala le pri skupini T3, kjer je bila povečana. Prav tako je bilo število žleznih izvodil na režnjič značilno zmanjšano le pri skupini T3. Pri meritvah površine ter števila seroznih acinusov in površine žleznih izvodil ter števila žlezih izvodil/režnjič ni bilo opaznih značilnih razlik.



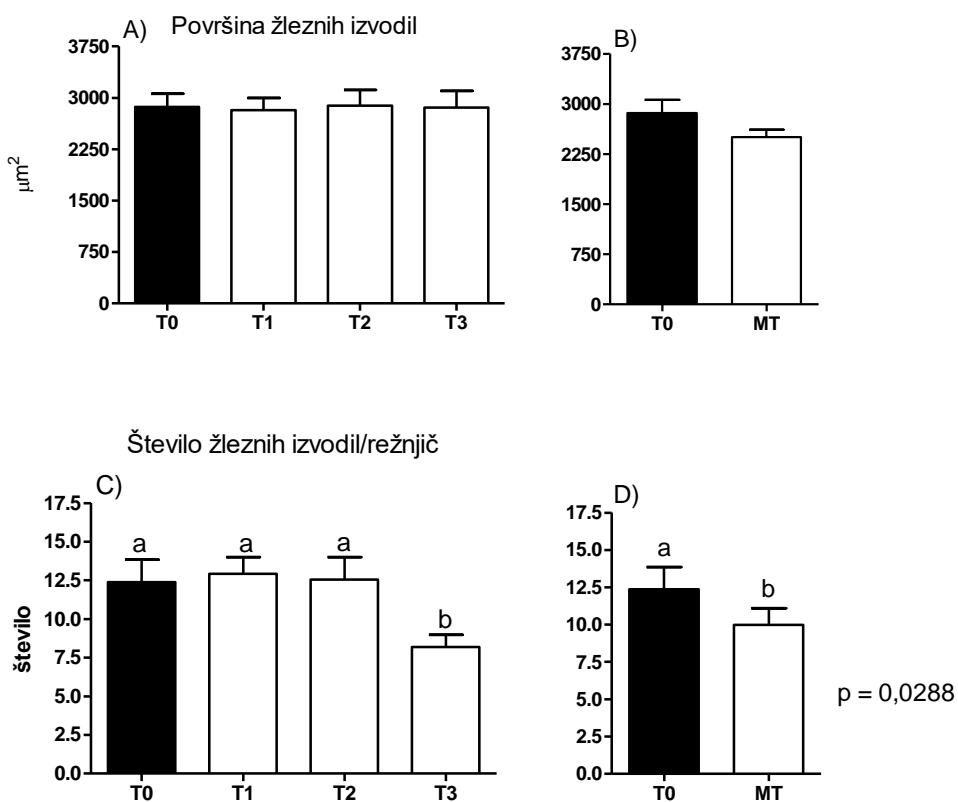
Graf 4.2: Vpliv dodatka tanina na površino režnjičev podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine režnjičev. ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

Graph 4.2: Influence of the tannin supplementation on the area of the lobule in parotid gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5 % of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the lobule. ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.



Graf 4.3: Vpliv dodatka tanina na površino in število seroznih acinusov podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine seroznih sinusov, C) in D) število seroznih sinusov. ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

Graph 4.3: Influence of the tannin supplementation on the serous acini and number of serous acini. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5 % of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of serous acini area, C) and D) are the number of serous acini. ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.

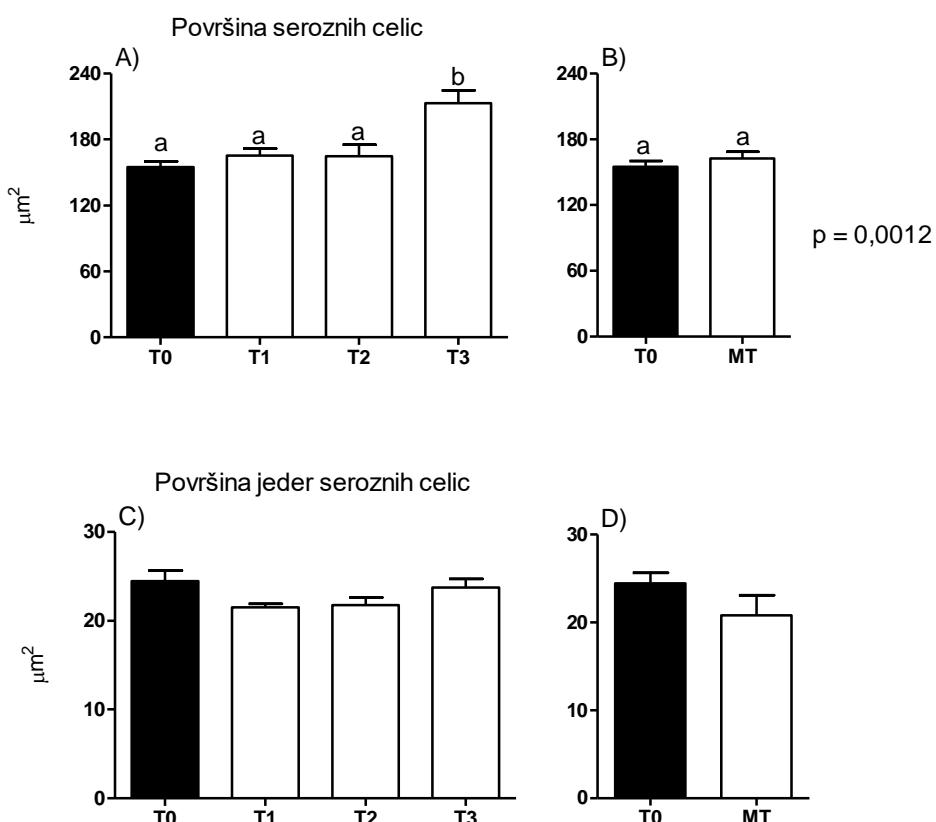


Graf 4.4: Vpliv dodatka tanina na površino žleznih izvodil in število žleznih izvodil/režnjič podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine izvodil, C) in D) število žleznih izvodil/režnjič. ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

Graph 4.4: Influence of the tannin supplementation on the area of the ducts and the number of ducts/lobule in parotid gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5 % of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the ducts, C) and D) are the number of ducts/lobule. ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.

4.3.3 Meritve površine seroznih celic in jeder seroznih celic pri podušesni slinski žlezi

Na **Grafu 4.5** so prikazane meritve površine seroznih celic in jeder seroznih celic podušesne slinske žleze pri štirih poskusnih skupinah (T1, T2, T3 in MT), v primerjavi s kontrolno skupino (T0). Ugotovili smo značilen vpliv dodatka taninov na površino seroznih celic (**Graf 4.5**). Površine seroznih celic so bile povečane pri skupini T3 ($p = 0,0012$).



Graf 4.5: Vpliv dodatka tanina na površino celic seroznih žlez in jeder celic seroznih žlez podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavlja meritve površine seroznih celic, C) in D) površine jeder seroznih celic. ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

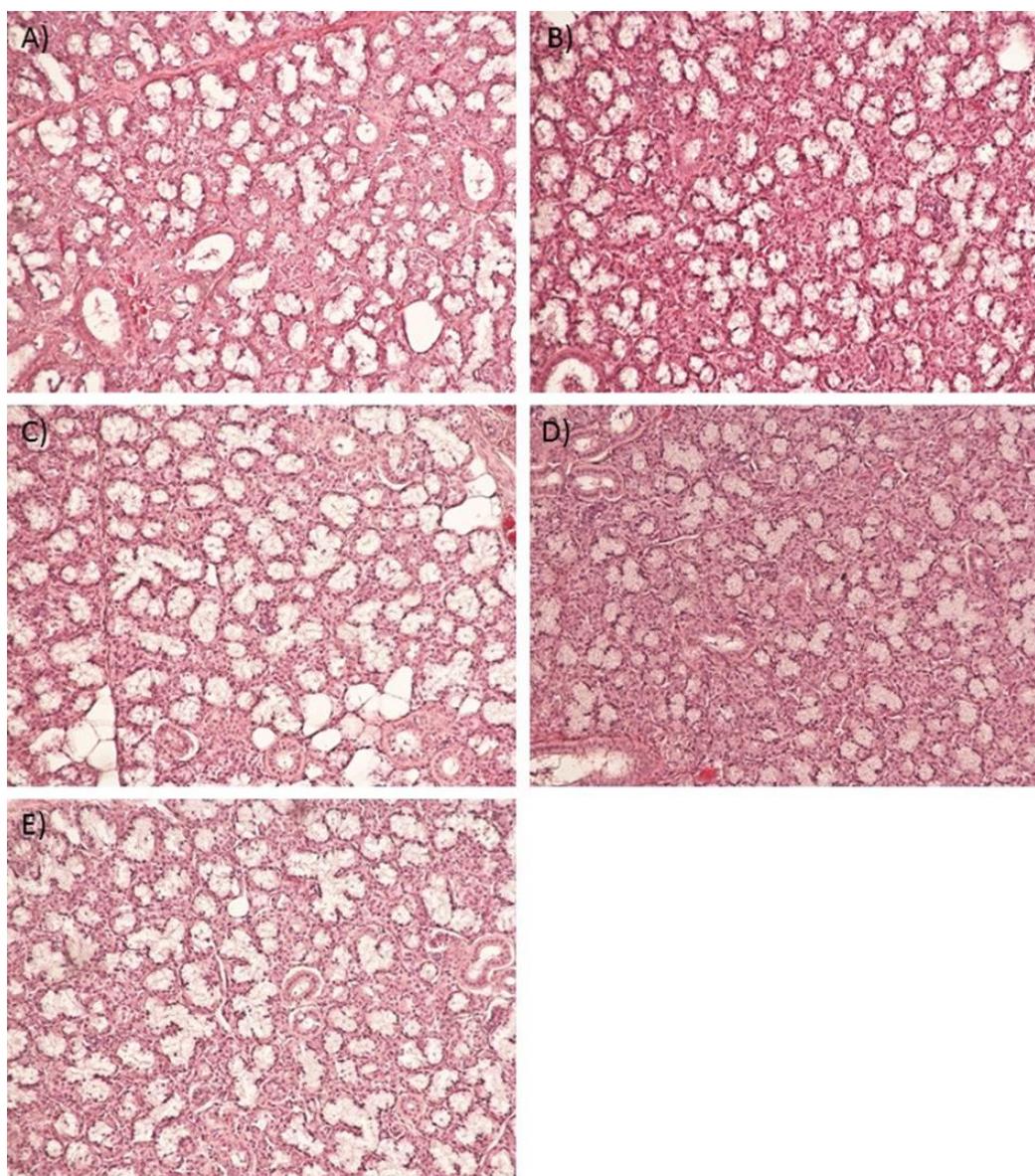
Graph 4.5: Influence of the tannin supplementation on the area of the serous cells and nuclei area of serous cells in parotid gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the serous cells, C) and D) measurement of nuclei area of the serous cells. ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.

4.4 HISTOLOŠKI PRIKAZ IN PRIKAZ REZULTATOV MORFOMETRIČNE ANALIZE PRI SPODNJEČELJUSTNI SLINSKI ŽLEZI

4.4.1 Histološki prikaz spodnječeljustne slinske žleze

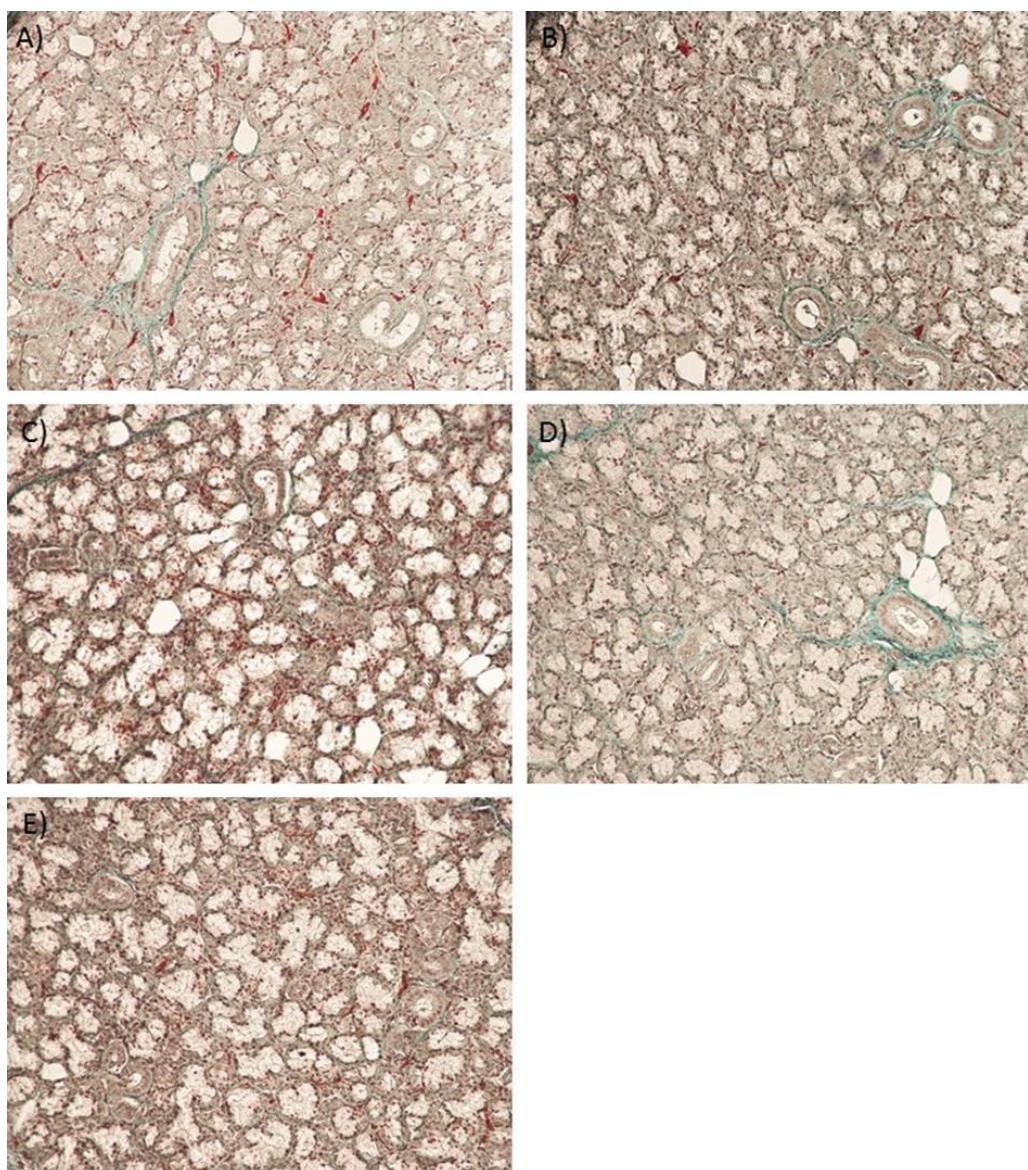
Histološka zgradba je ustrezala značilni zgradbi, ki jo poznamo pri prašičih (25) (**Slika 4.3**).

Na preparatih, obarvanih s trikromnim barvanjem po Goldnerju, sta bili zaradi zelene obarvanosti vezivnega tkiva bolj očitna velikosti režnjev in žleznih acinusov. Razlika je bila še bolj očitna kot pri preparatih podušesne žleze. Med opazovanimi skupinami ni bilo opaziti očitnejših razlik v količini vezivnega tkiva (**Slika 4.4**).



Slika 4.3: Mukozni in mešani acinusi spodnjeceljustne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (HE, 10 x). A) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; B) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; C) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; D) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; E) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.3: Mucose and mixed acini of mandibular salivary gland in different experimental groups (HE, 10 x). A) T0: Control group, fed a standard mixture; B) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; C) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; E) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.

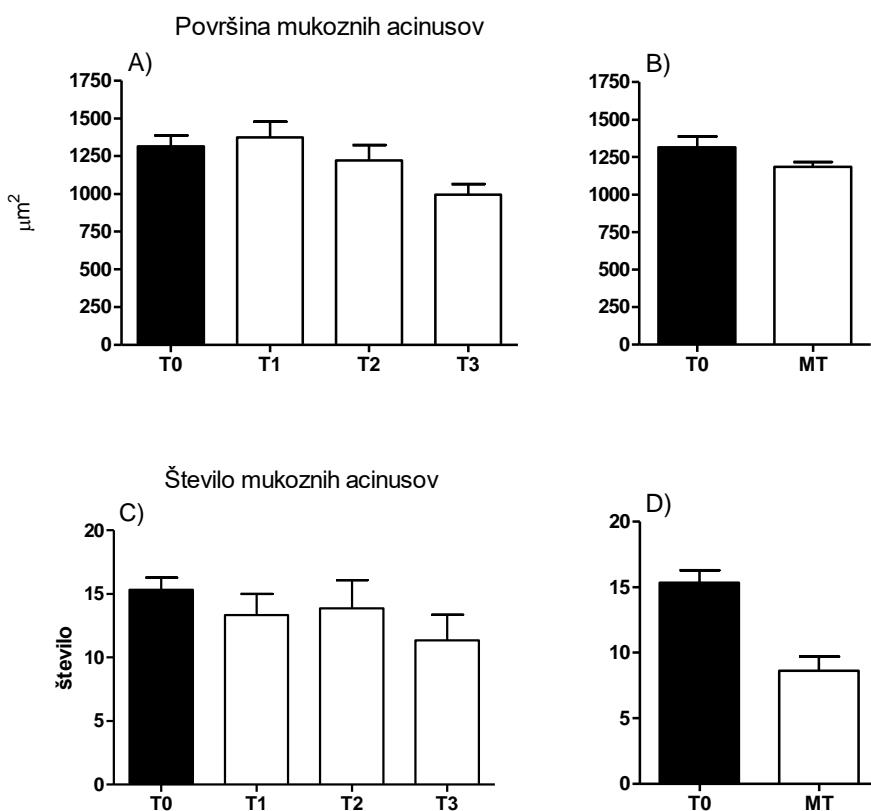


Slika 4.4: Mukozni in mešani acinusi spodnječeljustne slinske žleze pri različnih poskusnih skupinah (trikromno barvaje po Goldnerju, 10 x). A) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; B) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; C) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; D) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; E) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.4: Mucose and mixed acini of mandibular gland in different experimental groups (Goldner's Trichrome method, 10 x). Examples of parotid glands from different experimental groups are shown. A) T0: Control group, fed a standard mixture; B) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; C) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; E) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.

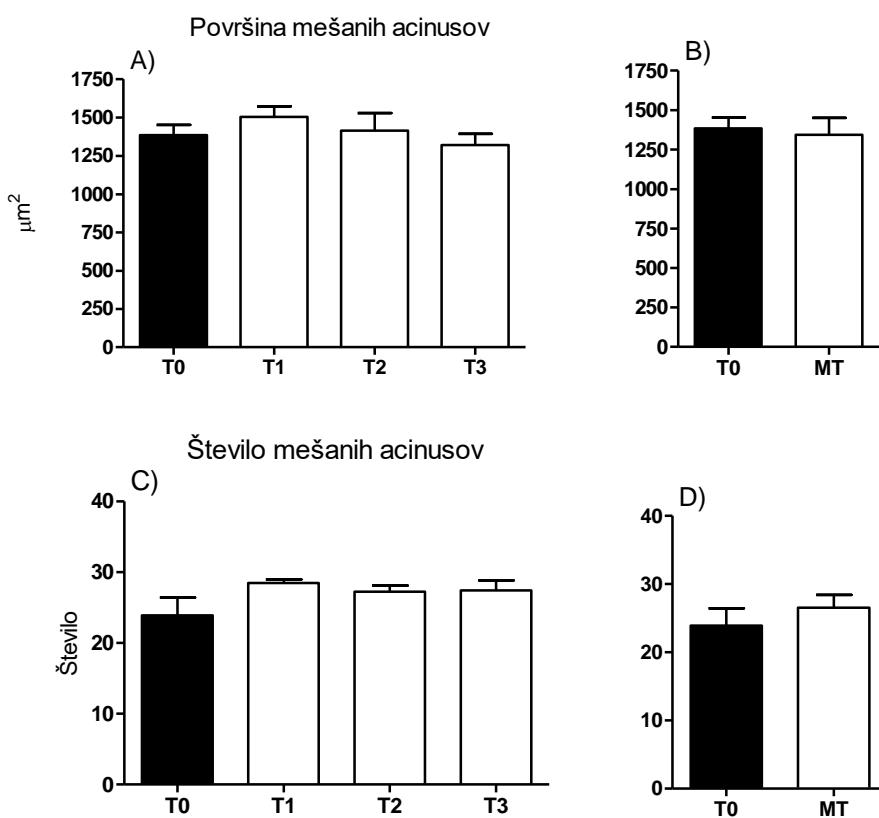
4.4.2 Meritve površine in števila mukoznih in mešanih acinusov ter izvodil pri spodnječeljustni slinski žlezi

Na **Grafih 4.6, 4.7 in 4.8** so prikazane meritve površine mukoznih acinusov, števila mukoznih acinusov, površine mešanih acinusov, števila mešanih acinusov, površine žleznih izvodil in števila žleznih izvodil spodnječeljustnih slinskih žlez. Ugotovili smo, da se izmerjeni parametri pri spodnječeljustnih žlezah med kontrolno skupino (T0) ter preiskovanimi poskusnimi skupinami (T1, T2, T3 in MT), ki so v krmi dobivale različno vsebnost taninov, statistično značilno ne razlikujejo. Kljub temu pa velja omeniti tendenco vpliva na število mukoznih acinusov ($P = 0,128$); kjer je bilo največje zmanjšanje opaziti pri skupini MT (43,8-odstotno zmanjšanje). Tendenco zmanjšanja površine žleznih izvodil (za 25,7 odstotka) pa smo ugotovili tudi pri skupini T3 ($P = 0,1154$).



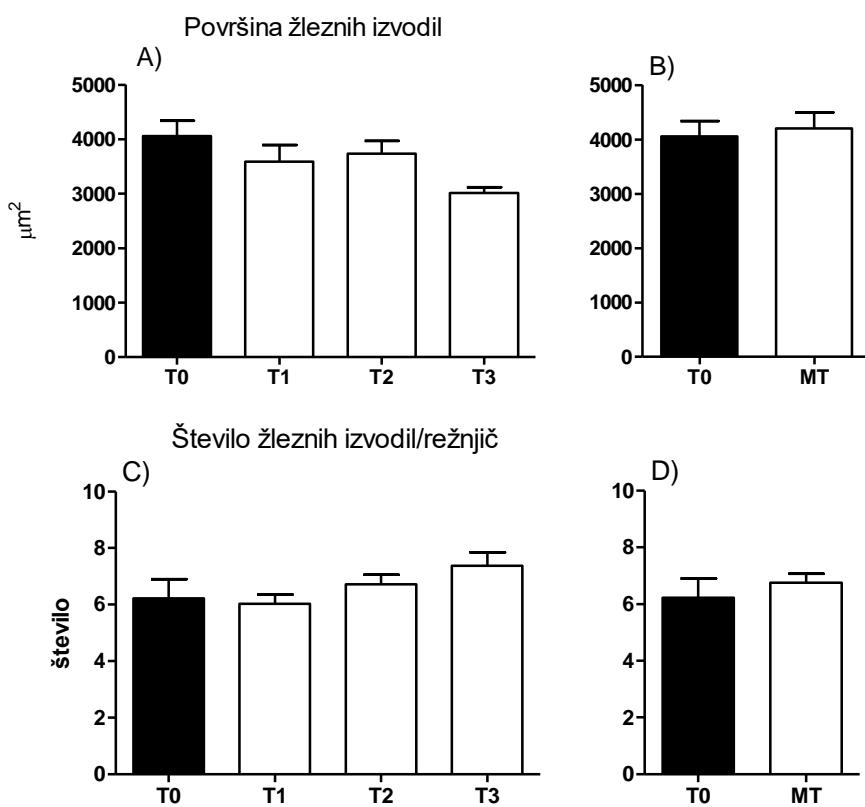
Graf 4.6: Vpliv dodatka tanina na površino in število mukoznih acinusov spodnječeljustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine mukoznih acinusov, C) in D) število mukoznih acinusov.

Graph 4.6: Influence of the tannin supplementation on the area and number of mucous acini in mandibular salivary gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the mucous acini, C) and D) measurement of number of mucous acini.



Graf 4.7: Vpliv dodatka tanina na površino in število mešnih acinusov spodnjeceljustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine mešnih acinusov, C) in D) število mešnih acinusov.

Graph 4.7: Influence of the tannin supplementation on the area and number of mixed acini in mandibular salivary gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the mixed acini, C) and D) measurement of number of mixed acini.

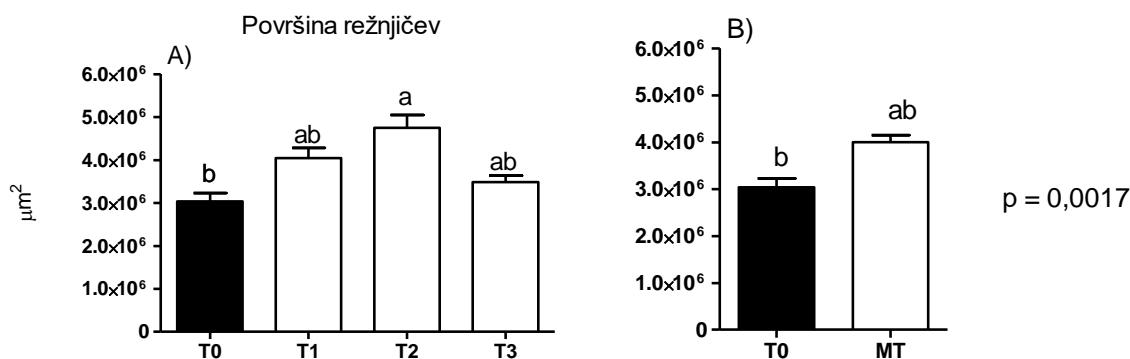


Graf 4.8: Vpliv dodatka tanina na površino žleznih izvodil in število žleznih izvodil spodnjeceljustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine žleznih izvodil, C) in D) število žleznih izvodil.

Graph 4.8: Influence of the tannin supplementation on the area and the number of glandular ducts in mandibular salivary gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5 % of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the glandular ducts, C) and D) measurement of number of glandular ducts.

4.4.3 Meritve površine režnjičev pri spodnječeljustni slinski žlezi

Na **Grafu 4.9** je prikazana površina režnjičev merjena na spodnječeljustnih slinskih žlezah različnih poskusnih skupin. Ugotovili smo značilen vpliv dodatka taninov na površino režnjičev (povečanje); se je pa statistično značilno razlikovala od kontrole le skupina T2 ($P = 0,0011$).

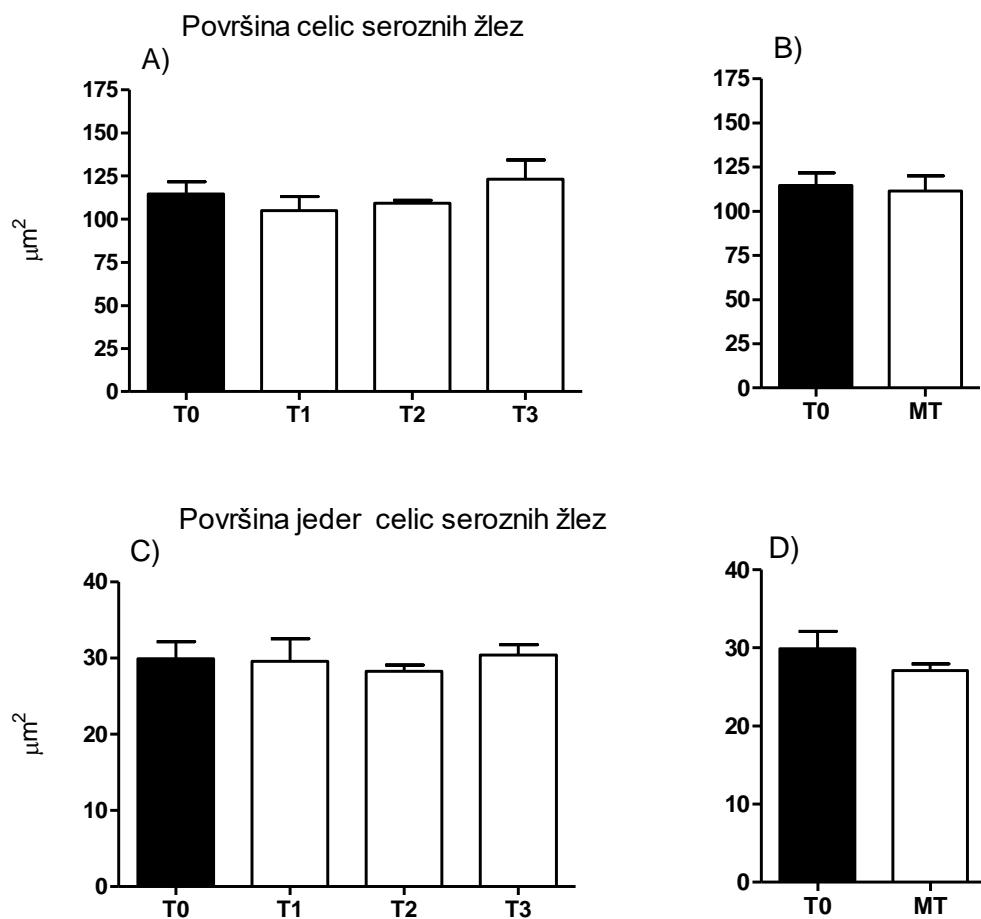


Graf 4.9: Vpliv dodatka tanina na površino režnjičev spodnječeljustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine režnjičev. ^{a-b}Statistično značilne razlike med poskusnimi skupinami so označene z različnimi nadpisanimi črkami.

Graph 4.9: Influence of the tannin supplementation on the area of lobules in mandibular gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of lobules. ^{a-b}Statistically significant differences between the treatment groups are denoted by different superscript letters.

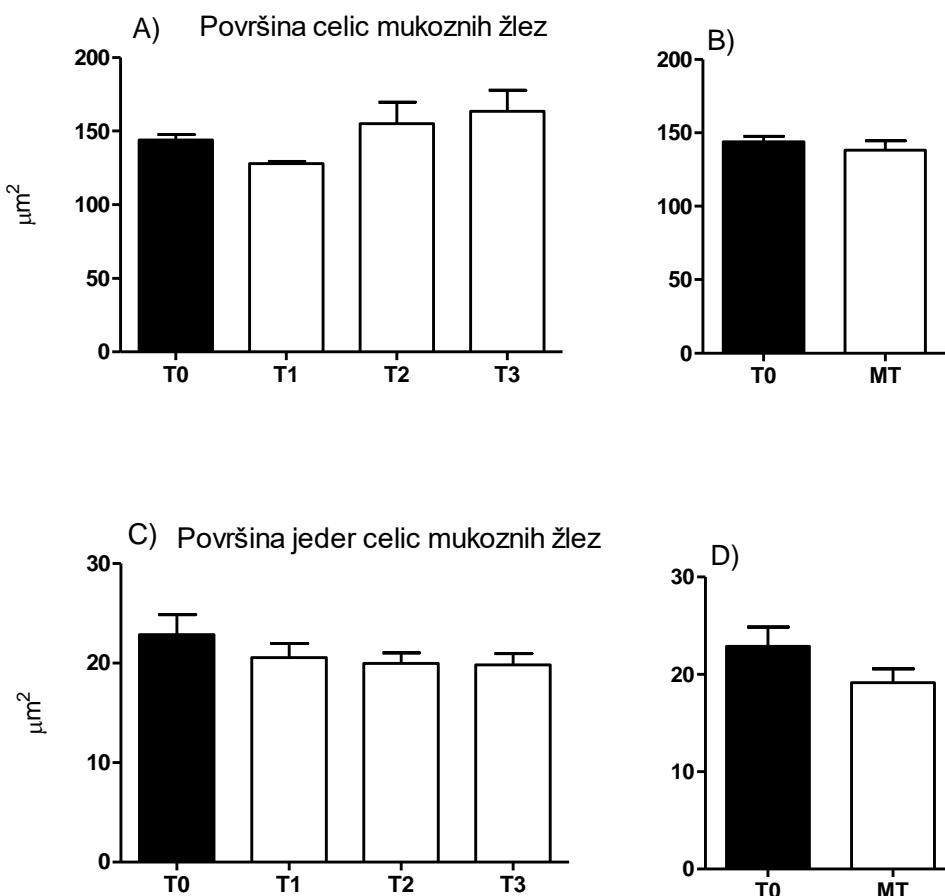
4.4.4 Meritve površine celic in jeder pri seroznih in mukoznih žlezah spodnječeljustne slinske žleze

Na **Grafih 4.10 in 4.11** so prikazane meritve površine celic seroznih žlez, površine jeder celic seroznih žlez, površine mukoznih žlez in površine jeder celic mukoznih žlez spodnječeljustne slinske žleze. Ugotovili smo, da se parametri meritev pri spodnječeljustnih žlezah med kontrolno skupino (T0) ter preiskovanimi poskusnimi skupinami (T1, T2, T3 in MT), ki so v krmu dobivale različno vsebnost taninov, statistično značilno ne razlikujejo. Omeniti velja meritev površine celic mukoznih žlez, kjer je bila ugotovljena tendenca zmanjšanja za 29,11 odstotka za skupino T1 ($P = 0,1332$).



Graf 4.10: Vpliv dodatka tanina na površino celic seroznih žlez in površino jeder celic seroznih žlez spodnejčeļjustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine seroznih žlez, C) in D) površine jeder seroznih žlez.

Graph 4.10: Influence of the tannin supplementation on the area of the serous glands cells and the nuclei of serous glands cells in mandibular salivary gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the serous glands, C) and D) measurement of nuclei area of the serous cells.



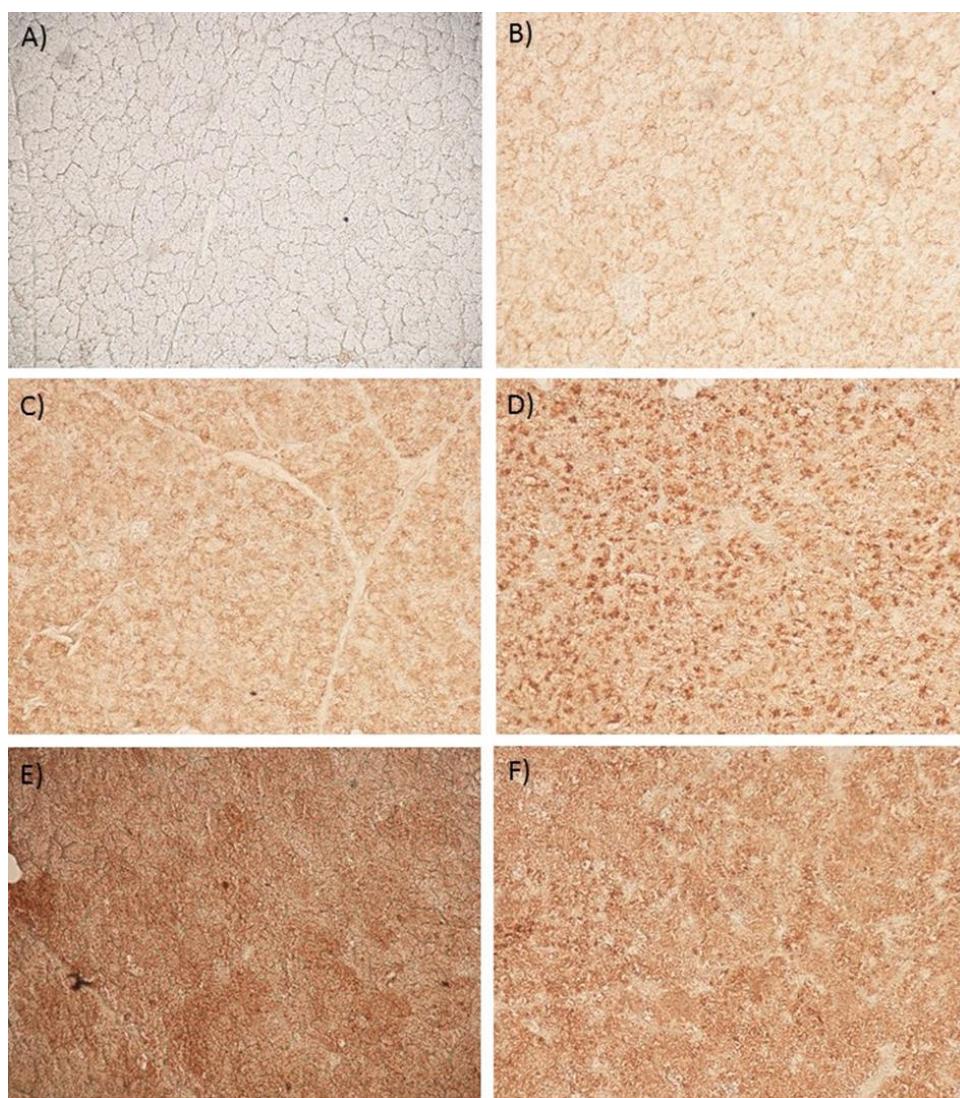
Graf 4.11: Vpliv dodatka tanina na površino celic mukoznih žlez in površino jeder celic mukoznih žlez spodnječeljustne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapulisiranih taninov. A) in B) predstavljata meritve površine mukoznih žlez, C) in D) meritve površine jeder mukoznih žlez.

Graph 4.11: Influence of the tannin supplementation on the area of the mucous gland cells and the nuclei of mucous gland cells in mandibular salivary gland. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of the area of the mucous glands, C) and D) measurement of nuclei area of the mucous cells.

4.5 IMUNOHISTOKEMIČNE MERITVE PODUŠESNIH SLINSKIH ŽLEZ

4.5.1 Imunohistokemično barvanje podušesnih slinskih žlez s protitelesi proti PRB2

Na **Sliki 4.5** so predstavljeni rezultati imunohistokemičnega barvanja pri reprezentativnih vzorcih podušesnih slinskih žlez pri različnih poskusnih skupinah (T0, T1, T2, T3 in MT) v primerjavi z negativno kontrolo (naključno izbran preparat podušesne žleze, brez dodatka primarnih protiteles, ostali del protokola barvanja je nespremenjen). Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRB2 je pokazalo med preiskovanimi skupinami različno intenzivnost obarvanja celic v žleznih acinusih, kjer se PRB2 nahaja. Porazdelitev obarvanosti na posameznih preparatih je bila uniformno porazdeljena; razlikovala se je le na področju veziva, kjer značilne obarvanosti nismo opazili. Najmanj intenzivno je bila obarvana kontrolna skupina T0, najbolj pa T3, kar smo dodatno kvantitativno ocenili z določanjem parametra »Sum density« (**Graf 4.12**).

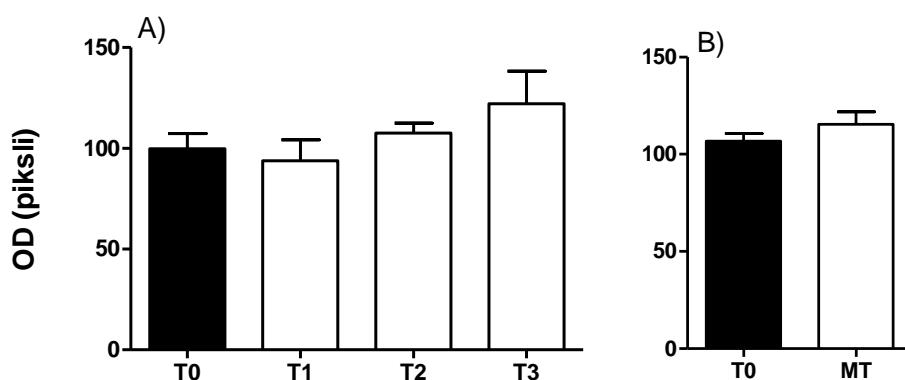


Slika 4.5: Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRB2, 40 x. Prikazani so primeri podušesnih slinskih žlez različnih poskusnih skupin. A) Negativna kontrola; B) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; C) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; D) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; E) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; F) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.5: Immunohistochemical staining with PRB2, 40 x. Examples of parotid glands from different experimental groups are shown. A) Negative control; B) T0: Control group, fed a standard mixture; C) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; E) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; F) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.

4.5.2 Meritve parametra »Sum density« pri PRB2

Rezultati imunohistokemičnega barvanja so nakazali povečano vsebnost bazičnih proteinov PRP (PRB2) v podušesnih slinskih žlezah merjaščkov. Intenzivnost obarvanja, ki izraža večjo količino PRB2 v žleznih acinusih je bila največja v poskusnih skupinah T3 (za 22,35-odstotka povečana v primerjavi s skupino T0) in MT (15,65 odstotka povečana v primerjavi s skupino T0) (Graf 4.12), vendar se vpliv ni izkazal kot statistično značilen.



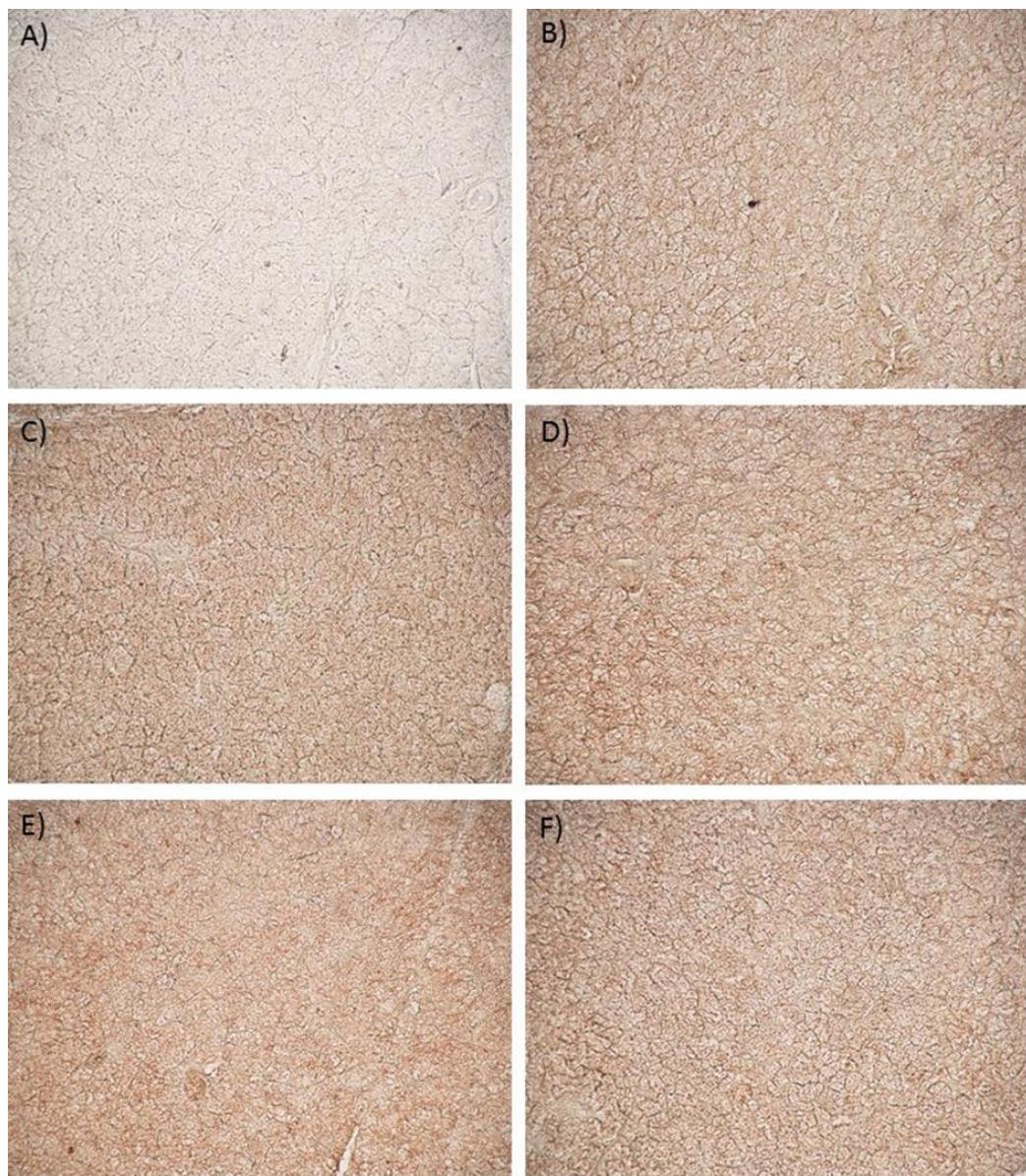
Graf 4.12: Vpliv dodatka tanina na merjen parameter »sum density« imunohistokemičnega barvanja PRB2 podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve parametra »Sum density«.

Graph 4.12: Influence of the tannin supplementation on the measured parameter “sum density” of immunohistochemical staining of PRB2 in parotid glands. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of »sum density« parameter.

4.5.3 Imunohistokemično barvanje podušesnih slinskih žlez s protitelesi proti PRH1/2

Na Sliki 4.6 so predstavljeni rezultati imunohistokemičnega barvanja pri reprezentativnih vzorcih podušesnih slinskih žlez pri različnih poskusnih skupinah (T0, T1, T2, T3 in MT) v primerjavi z negativno kontrolo. Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRH1/2 se je med preiskovanimi skupinami pokazalo s primerljivo intenzivnostjo obarvanja celic v žleznih acinusih, kjer se PRH1/2 nahaja. Porazdelitev obarvanja na preparatih je bila uniformna;

razlikovala se je le na področju veziva, kjer značilne obarvanosti nismo opazili. Pozitivno obarvanost smo kvantitativno ocenili z meritvijo parametra »sum density« (**Graf 4.13**).

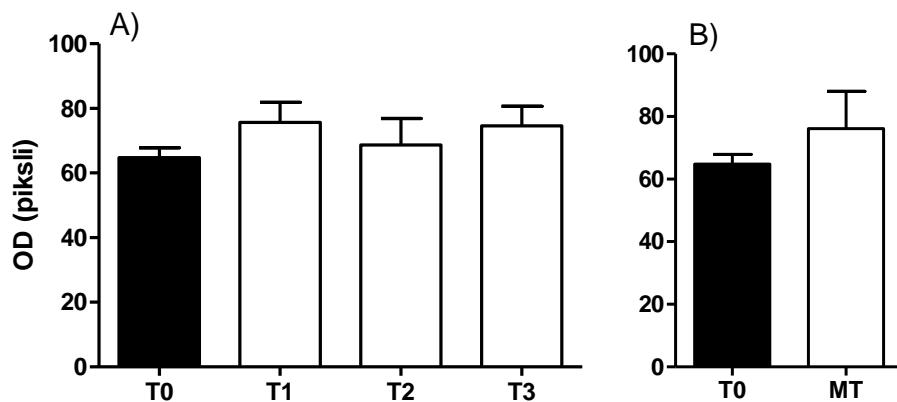


Slika 4.6: Imunohistokemično barvanje s protitelesi proti PRH1/2, 40 x. Prikazani so primeri podušesnih slinskih žlez različnih poskusnih skupin. A) Negativna kontrola; B) T0: kontrolna skupina, krmljena s standardno krmno mešanico; C) T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; D) T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; E) T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; F) MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1,5-odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov.

Figure 4.6: Immunohistochemical staining with PRH1/2, 40 x. Examples of parotid glands from different experimental groups are shown. A) Negative control; B) T0: Control group, fed a standard mixture; C) T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; D) T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; E) T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; F) MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan.

4.5.4 Meritve parametra »Sum density« pri PRH1/2

Rezultati imunohistokemičnega barvanja niso pokazali značilnega povečanja vsebnosti kislih proteinov PRP (PRP1/2) v podušesnih slinskih žlezah merjaščkov po dodatku različnih količin taninov v obroku. Intenzivnost obarvanja, ki izraža količino PRP1/2 v žleznih acinusih je bila med preiskovanimi skupinami primerljiva (**Graf 4.13**).



Graf 4.13: Vpliv dodatka tanina na merjen parameter »sum density« imunohistokemičnega barvanja PRH1/2 podušesne slinske žleze. T0: kontrolna skupina, krmiljena s standardno krmno mešanico; T1: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 1-odstotni dodatek taninov; T2: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 2-odstotni dodatek taninov; T3: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala še 3-odstotni dodatek taninov; MT: skupina, ki je poleg standardne krmne mešanice dobivala 1,5 -odstotni dodatek mikroenkapsuliranih taninov. A) in B) predstavljata meritve parametra »Sum density«.

Graph 4.13: Influence of the tannin supplementation on the measured parameter “sum density” of immunohistochemical staining of PRH1/2 in parotid glands. T0: Control group, fed a standard mixture; T1: Group, fed a standard mixture supplemented with 1% of the tannin-rich extract Farmatan; T2: Group, fed a standard mixture supplemented with 2% of the tannin-rich extract Farmatan; T3: Group, fed a standard mixture supplemented with 3% of the tannin-rich extract Farmatan; MT: Group, fed a standard mixture, supplemented with 1.5% of microencapsulated tannin-rich extract Farmatan. A) and B) are measurement of sum density parameter.

5 RAZPRAVA

Namen naše naloge je bil proučiti vpliv različnih koncentracij taninov v krmi na morfologijo žlez slinavk (podušesne in spodnječeljustne slinske žleze) ter izražanje kislih in bazičnih proteinov PRP v podušesni slinski žlezi. Pridobljeni rezultati kažejo na značilen vpliv višjih koncentracij taninov na povečanje mase podušesne slinske žleze in na nekatere izmerjene morfometrične parametre v podušesni slinski žlezi. V skupini T3, ki je v krmi dobivala najvišji delež taninov, smo opazili statistično značilno povečanje površine acinusov, režnjičev in seroznih celic. Višje koncentracije taninov niso povzročile statistično značilnega povišanja kislih in bazičnih proteinov PRP v podušesnih slinskih žlezah. Pri manjših koncentracijah taninov v krmi (T1, T2) nismo opazili značilnih vplivov. Pri dodatku mikroenkapsuliranih taninov (MT) smo opazili značilne vplive pri manjšem številu merjenj različnih parametrov. Pri spodnječeljustni žlezi ni bilo značilnega vpliva dodatka taninov, razen povečanih režnjičev in tendence zmanjšanja mase spodnječeljustne slinske žleze.

Pri najvišjem odmerku taninov v krmi (skupina T3) je bila konzumacija krme manjša in posledično prirast prašičev nekoliko nižji (9), kar kaže na to, da so prašiči to krmo manj radi zauživali. Za tanine je značilno, da so zelo adstringentni, kar povzroča suh in trpek občutek. Kot zanimivost lahko omenimo, da pri pregledu jetrnega tkiva prašičev iz različnih skupin nismo zasledili toksičnih učinkov na jetrno tkivo, prej ugodne učinke, ki so se kazali v manjši količini interlobularnega veziva in eozinofilnih granulocitov, kar bi lahko kazalo na ugodno protiparazitarno delovanje taninskega pripravka (neobjavljeni podatki).

V študiji smo uporabili še 1,5-odstotno koncentracijo tanina, ki je bil v mikroenkapsulirani obliki. Mikroenkapsulacija je proces, pri katerem se različne trde in tekoče učinkovine zaprejo v ponavadi lipofilno ovojnico. Takšen način dodajanja učinkovine omogoča nadzorovanje in prirejeno sproščanje učinkovine, hkrati pa prekriva okus in vonj. Zaradi adstringentnega učinka in gorenjskega okusa je zauživanje večje količine taninov težje, vnos v mikroenkapsulirani obliku pa tudi s tega vidika učinkovitejši, še posebej pri višjih koncentracijah. Mikroenkapsulacija tanina naj bi tako zmanjšala adstringentni učinek tanina in s tem povečala količino zaužitega tanina (36, 37). Kljub pol manjši količini dodanega tanina v skupini MT, pa je bil učinek na slinske žleze pri skupini MT v naši raziskavi pogosto podoben učinku pri skupini T3, kar lahko kaže na to, da so prašiči krmo temeljito prežvečili,

da je morda ovojnica lahko vplivala na odziv slinske žleze ali pa, da so bile izgube tanina v krmi skupine MT manjše (pri vmešavanju v krmo so izgube mikroenkapsuliranega tanina manjše kot pri navadnem pripravku, ki je precej hidroskopski). V naši študiji smo dodajali nizek odstotek taninov v mikroenkapsulirani obliki.

Za prašiče je značilno, da so prilagojeni na dieto bogato s tanini, kot je dokazano za prašiče iberijske pasme, ki se v določenem obdobju leta (jeseni in pozimi) prehranjujejo z želodom (11, 38), ki vsebuje več kot 5-odstotni delež hidrolizirajočih taninov v SS (39). Prilagoditev na prehrano, ki vsebuje veliko želoda, vključuje tudi povečanje podušesne slinske žleze (parotidomegalijo) (11, 17, 40), ki je bila opazna tudi pri naši študiji. Vključuje tudi povečano izražanje proteinov PRP v slini, ki imajo visoko sposobnost vezave s tanini in na ta način nevtralizirajo njihove neugodne učinke. Kot sta opisala Carlson in sod. (41) in Shimada in sod. (12), so bili podobni učinki ugotovljeni še pri drugih vrstah sesalcev poleg prašičev.

Rezultati meritev mase slinskih žlez pri prašičih vključenih v naši študiji kažejo na to, da se je teža podušesnih slinskih žlez v skupini T3 povečala kar za 2,5-krat, v skupinah T1 in T2 pa za 1,3-krat. V našem delu študije, ki obravnava tudi vpliv 1,5-odstotnega dodatka mikroenkapsuliranih taninov, smo pri tej obliki dodatka opazili 1,8-kratno povečanje podušesnih slinskih žlez v primerjavi s kontrolno skupino. Velikost učinka, izračunana s pomočjo parametra Hedges g , s pomočjo katerega smo pridobili rezultate, ki nam še bolj praktično opišejo pomembnost razlik v teži podušesnih slinskih žlez, so pokazali najvišji učinek pri skupinah T3 in MT. V nasprotju s podušesno slinsko žlezo se je spodnječeljustna slinska žleza zmanjšala v skupinah T3 in MT, kar lahko pripisemo razlike v fiziološki funkciji teh dveh žlez. Pri spodnječeljustni žlezi smo opazili le tendenco vpliva na velikost učinka, ki je bila najbolj izražena pri skupinah T2 in T3. Statistična značilnost in velikost učinka bi morda bila ob večjem številu vzorcev večja. Opažene razlike kažejo tudi na to, da je skupina MT podobna skupini T3, kljub manjši količini dodatka taninov v krmo. Vzrok bi lahko bil v slabšem vmešavanju 3-odstotnega tanina v krmo ali pa v vplivu kapsule taninov, ki so bili krmljeni v mikroenkapsulirani obliki na izločanje sline in s tem na merjene parametre v podušesni slinski žlezi.

Podušesna slinska žleza je serozna, spodnječeljustna žleza pa je mešana serozno-mukozna slinska žleza (42). Slednja sodeluje tudi pri izločanju feromonov. Androstenon deluje kot

feromon in stimulira spolno obnašanje svinj (43). V raziskavi (44) so primerljivo dokazali, da se teža spodnječeljustne slinske žleze pri hranjenju z višjo vsebnostjo taninov zmanjša. Manjša teža spodnječeljustne žleze je sorazmerno z njeno funkcijo izločanja feromonov sovpadala tudi z zmanjšano koncentracijo androstenona v maščobnem tkivu. Zaključili so tudi, da lahko vključevanje taninov v obrok pri prašičih, ki še niso dosegli spolne zrelosti in pri katerih se androstenon še ne izloča, značilno zmanjša produkcijo in raven androstenona v tkivih prašičev in lahko s tem bistveno vpliva na zmanjšanje vonja po merjascu. Vpliv je tako pri spodnječeljustni žlezi posreden. V naši raziskavi je bila vidna tendenca k zmanjševanju žleze ob povečanem dodatku taninov v krmi, v raziskavi Bee in sod. (44) pa je bil vpliv značilen, kar kaže na skladnost podatkov.

Objavljenih je več študij o vplivu taninov na mikroskopsko zgradbo slinskih žlez, ki pa so redko osredotočene na več različnih parametrov. V naši študiji smo ocenjevali morfometrične in imunohistokemične spremembe v podušesni in spodnječeljustni slinski žlezi. Največ sprememb smo odkrili v podušesni slinski žlezi, kjer so bile razlike med skupinama T0 in T3 (skupina s 3-odstotnim dodatkom taninov v obroku) statistično značilne v površini acinusov, površini režnjičev in površini seroznih celic. Razlike v številu acinusov, površini in številu izvodil ter površini jeder seroznih celic, niso bile statistično značilne. Pri spodnječeljustni slinski žlezi, kjer smo merili površino in število mukoznih ter mešanih žlez, površino in število izvodil, površino režnjičev, površino jeder seroznih in mukoznih celic ter površino seroznih in mukoznih celic nismo opazili značilnih sprememb, razen povečanih režnjičev pri skupini T2. V nobeni od žlez nismo opazili histopatoloških sprememb.

V študiji (11) so histološko ocenjevali hipertrofijo podušne slinske žleze. V dveh skupinah, ki sta bili sedem dni krmljeni s 26–36 g ekvivalentov taninske kisline na kg SS obroka, so v primerjavi s kontrolno skupino (brez taninov v obroku) dokazali povečano razmerje med citoplazmo in jedrom, kar nakazuje na povečano sekretorno aktivnost celic (11). V študiji (40), so parotidomegalijo ocenjevali na podlagi najdaljše dolžine cele podušne žleze, ki je bila pri skupini krmljeni s 50-odstotno vsebnostjo želoda v krmi (25 g ekvivalentov taninske kisline na kg SS), statistično značilno večja kot v kontrolni skupini. Tudi v tej študiji so na podlagi mikroskopskega pregleda določili razmerje med citoplazmo in jedrom ter zaključili, da je razmerje značilno večje pri preiskovanih skupinah v primerjavi s kontrolno. V nasprotju z našo raziskavo, kjer smo merili površino posameznih preiskovanih elementov, so v tej merili

dolžino celic in jeder. Tudi v naši študiji smo pri skupini T3 ugotovili značilno povečanje citoplazme seroznih celic in deloma tudi jeder, kar kaže na povečano razmerje med citoplazmo celic in jedri in tako na povečano sekretorno aktivnost seroznih žleznih acinusov v podušesni slinski žlezi. Cappai in sod. (40) so opazili tudi, da so bile tarčne celice, na katere so delovali tanini v krmi, v acinarnih celicah parenhima žleze in ne v izvodilih, kjer najdemo izoprizmatični epitelij. Ta naj ne bi bil vključen v povišano aktivnost delovanja žleze.

Povečanje podušesne slinske žleze zaradi učinka taninov je opisano tudi pri miškah (30). Dokazali so, da se ob povečani vsebnosti taninov v krmi poveča površina žleznih acinusov (30). V dotednejši študiji so površine žleznih acinusov izmerili na slikah, zato se enote in vrednosti razlikujejo od naših meritev in rezultatov, vendar so učinki primerljivi. Za druge živalske vrste nismo našli podatkov.

V drugem delu naloge smo se osredinili na raziskovanje povezave med povečanjem mase podušesnih slinskih žlez (parotidomegalijo) in vsebnostjo bazičnih in kislih proteinov PRP v žlezi. Proteine PRP v podušesni slinski žlezi smo označili z dvema vrstama protiteles: proti PRB2, ki označi bazične proteine in proti PRH1/2, ki označi kiske proteine.

Povečanje proteinov PRP v slini, za katere je značilno blažilno delovanje proti nekaterim učinkom taninov, naj bi imelo trojno naloge: i) proteini PRP imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju zdravja v ustni votlini in zaščiti sluznice prebavnega trakta z vezavo na tanine in tvorbo taninsko-proteinskih precipitatov; ii) proteini PRP, predvsem BPRP, so sestavljeni iz večje količine neesencialne aminokisline prolina, ki ima veliko selektivno sposobnost vezave za tanine zaradi svoje odprte strukture in fizikalno-kemičnih lastnosti, kar naj bi vplivalo na to, da tanini ne precipitirajo esencialnih aminokislin in s tem zmanjšujejo neugodne učinke, ter iii) kompleksi tanini-proteini PRP zmanjšujejo aktivnost prebavnih encimov in s tem uporabo hranilnih snovi (11).

Več študij opisuje vpliv povečanega izločanja proteinov PRP iz podušesne slinske žleze na hipertrofijo žleze ob dodatku taninov (11, 17, 30, 31). Tudi za prašiče je opisano, da naj bi proteini PRP nastajali bolj v podušesni kot v spodnječeljustni žlezi, kar se tudi ujema s podatki v naši študiji, kjer smo opazili višje ravni bazičnih proteinov PRP samo v podušesni žlezi. Višje ravni proteinov PRP so bile skladne s spremembami v podušesni žlezi, ki smo jih opazili pri histometričnih meritvah. Ker v spodnječeljustni žlezi nismo opazili statistično

značilnih razlik v histomorfoloških parametrih med poskusnimi skupinami, smo imunohistokemična barvanja s protitelesi proti bazičnim in kislim proteinom PRP opustili.

Povečane koncentracije proteinov PRP oz. prolina v podušesni žlezi pri prašičih, ki so bili izpostavljeni večjim koncentracijam želoda in s tem taninom kaže na vključitev t.i. adenomernih celic, ki so sproščale večje količine proteinov PRP v slino (11). Povečano izločanje proteinov PRP je bilo opisano tudi pri laboratorijskih živalih (miškah) in povezano z izražanjem genov za proteine PRP (45, 46).

Iz pridobljenih podatkov lahko sklepamo, da ima dodatek taninskega ekstrakta, vpliv na aktivnost slinskih žlez, predvsem podušesne slinske žleze. Tendenca k povišanem izločanju proteinov PRP pa kaže na pomembno vlogo sline kot prvega mehanizma obrambe organizma, da zaščiti sluznico požiralnika in želodca.

6 SKLEPI

1. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov oziroma 1,5-odstotnega mikroenkapsuliranega ekstrakta, so bile v skupini z najvišjim deležem taninov v obroku opazne razlike v teži podušesne slinske žleze in nakazan vpliv na zmanjšanje teže spodnječeljustne slinske žleze.
2. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov oziroma 1,5-odstotnega mikroenkapsuliranega ekstrakta, so bile v skupini z najvišjim deležem taninov v obroku opazne histometrične razlike – povečanje površine acinusov, režnjičev in seroznih celic pri podušesnih žlezah.
3. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov oziroma 1,5-odstotnega mikroenkapsuliranega ekstrakta pri spodnječeljustnih slinskih žlezah pri histometričnih meritvah ni bilo opaznih značilnih razlik, razen zmanjšanja žleznih režnjičev.
4. Med različnimi poskusnimi skupinami prašičev, ki jim je bil v osnovni obrok dodan 1, 2 in 3-odstotni delež ekstrakta hidrolizirajočih taninov oziroma 1,5-odstotnega mikroenkapsuliranega ekstrakta ni bilo opaženih statistično značilnih razlik pri imunohistokemičnem barvanju podušesne slinske žleze s kislimi in bazičnimi proteini PRP.

7 ZAHVALE

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Inštitutu za predklinične vede, Enoti za anatomijo, histologijo z embriologijo in citologijo, ki so omogočili moje delo, me pri delu spremljali in usmerjali.

Največja zahvala gre moji mentorici, doc. dr. Valentini Kubale Dvojmoč, za čas in pomoč, ki mi ju je posvetila ob izdelavi naloge. Iskrena hvala za potrpežljivost, prijaznost, spodbudo, zaupanje in vse znanje, ki ga je delila z mano. Zahvalila bi se tudi somentorici, izr. prof. dr. Marjeti Čandek-Potokar, za predloge, ideje in nasploh za to, da mi je omogočila opravljanje naloge v okviru svojega projekta.

Hvala tudi vodji raziskovalne skupine P4-0053, prof. dr. Milki Vrecl Fazarinc, za pomoč pri mikroskopiranju. Hvala tudi prof. dr. Gregorju Fazarincu, ki mi je ob mentorični odsotnosti vedno priskočil na pomoč in me usmerjal pri delu.

Iskrena hvala tudi Jasni Šporar, ki me je naučila osnov dela v histološkem laboratoriju in mi pomagala pri pripravi preparatov za nadaljnje delo.

Hvala tudi asistentki dr. Jani Brankovič za pomoč in prijazne nasvete pri mikroskopiranju.

Hvala lektorici dr. Andreji Perić Jezernik za pomoč pri urejanju slovenskega teksta in prof. dr. Catrin S. Rutland iz Veterinarske fakultete, Univerze v Nottinghamu, Anglija za urejanje angleškega teksta.

Zahvaliti se želim tudi mag. Giti Grečs-Smole za skrben pregled seznama literature.

Zahvala tudi moji družini in fantu za vso podporo in potrpežljivost.

8 LITERATURA

1. Prunier A, Bonneau M, von Borell EH, et al. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Anim Welf* 2006; 15: 277–89.
2. Claudi-Magnussen C. The consumers' view/reaction.
Acta Vet Scand 2006; 48 (Suppl 1): eS4 (2pp).
<https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-48-S1-S4>
3. Patterson RLS. 5 α -androst-16-ene-3-one: compound responsible for taint in boar fat. *J Sci Food Agric* 1968; 19: 31–8.
4. Claus R, Raab S. Influences on skatole formation from tryptophan in the pig colon. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 679–84.
5. Wesoly R, Weiler U. Nutritional influences on skatole formation and skatole metabolism in the pig. *Animals* 2012; 2: 221–42.
6. Doran E, Whittington FW, Wood JD, McGivan JD. Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2002; 140: 81–92.
7. Jensen B. Prevention of boar taint in pig production. Factors affecting the level of skatole. *Acta Vet Scand* 2006; 48(Suppl 1): eS6 (6 pp).
<https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-48-S1-S6>
8. Chung KT, Wei CI, Johnson MG. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci Tech* 1998; 9: 168–75.
9. Čandek-Potokar M, Škrlep M, Batorek Lukač N, Zamaratskaia G, Prevolnik Povše M, Velikonja Bolta Š, Kubale V, Bee G. Hydrolysable tannin fed to entire male pigs affects intestinal production, tissue deposition and hepatic clearance of skatole. *Vet J* 2015; 20: 162–7.
10. Bilić-Šobot D, Kubale V, Škrlep M, et al. Effect of hydrolysable tannins on intestinal morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. *Arch Anim Nutr* 2016; 70; 378–88.
11. Cappai MG, Wolf P, Pinna W, Kamphues J. Dose-response relationship between dietary polyphenols from acorns and parotid gland hypertrophy in pigs. *Food Nutr Sci* 2012; 3: 1261–8.

12. Shimada T. Salivary proteins as defense against dietary tannins. *J Chem Ecol* 2006; 32: 1149–63.
13. Mueller-Harvey I, McAllan AB. Taninns: their biochemistry and nutritional properties. In: Morrison IM, eds. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*. Vol 1. London: JAI Press, 1992: 151–217.
14. Bennick A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 184–96.
15. Ma H, Liu W, Frost L, et al. The hydrolysable gallotannin, penta-O-galloyl- β -D-glucopyranoside, inhibits the formation of advanced glycation endproducts by protecting protein structure. *Mol BioSyst* 2015; 11: 1338–47.
16. Zucker WV. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *Am Nat* 1983; 121: 335–65.
17. Cappai MG, Wolf P, Große Liesner V, et al. Effect of whole acorns (*Quercus pubescens*) shred based diet on parotid gland in growing pigs in relation to tannins. *Livest Sci* 2010; 134: 183–6.
18. Lorgue G, Lechenet J, Rivière A. Clinical veterinary toxicology. London: Blackwell Science, 1996: 5–194.
19. Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 2005; 92: 497–503.
20. Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2006; 86: 2010–37.
21. Biagi G, Cipollini I, Paulicks BR, Roth FX. Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 2010; 64: 121–35.
22. Konig HE, Liebich HG. Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas. 4th edition. Stuttgart: Schattauer, 2004: 284–6.
23. Dyce KM, Sack WO, Wensing JG. Textbook of veterinary anatomy. 4th ed. St. Louis: Saunders/Elsevier, 2010: 105–7.
24. Blair R. Nutrition and feeding of organic pigs. Wallingford: CABI, 2007: 24.
25. Boshell JL, Wilborn WH. Histology and ultrastructure of the pig parotid gland. *Am J Anat* 1978; 152: 447–64.
26. Štembírek J, Kyllar M, Putnová I, Stehlík L, Buchtová M. The pig as an experimental model for clinical craniofacial research. *Lab Anim* 2012; 46: 269–79.

27. Pavelka M, Roth J. Functional ultrastructure: An atlas of tissue biology and pathology. 1st edition. Wien: Springer-Verlag, 2005: 182–3.
28. Ferreira FD, Robinson R, Hand AR, Bennick A. Differential expression of proline-rich proteins in rabbit salivary glands. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1393–404.
29. Robinson R, Kauffman DL, Wayne MY, Blum M, Bennick A, Keller PJ. Primary structure and possible origin of non-glycosylated basic proline-rich protein of human submandibular/sublingual saliva. *Biochem J* 1989; 263: 497–503.
30. Costa G, Lamy E, Capela e Silva F, Andersen J, Sales Baptista E, Coelho AV. Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *J Chem Ecol* 2007; 34: 376–87.
31. Igoh A, Tomotake S, Doi Y. Detection of proline-rich proteins for the identification of saliva by enzyme-linked immunosorbent assay. *Leg Med* 2015; 17: 2010–3.
32. Hanovice-Ziony M, Gollop N, Landau SY. No major role for binding by salivary proteins as a defense against dietary tannins in Mediterranean goats. *J Chem Ecol* 2010; 36: 736–43.
33. Mole S, Butler LG, Iason G. Defense against dietary tannin in herbivores—a survey for proline-rich salivary proteins in mammals. *Biochem Syst Ecol* 1990; 18: 287–93.
34. Makkar HPS, Becker K. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Anim Sci* 1998; 67: 277–81.
35. Klobučar I. Vpliv zmanjšane dejavnosti ščitnice na razvoj mod pri prašiču: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2000.
36. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. Alginat v dostavnih sistemih s priejenim sproščanjem. *Farm Vest* 2008; 59: 293–301.
37. Zhao W, Iyer V, Flores FP, Donhove E, Kong F. Microencapsulation of tannic acid for oral administration inhibit carbohydrate digestion in the gastrointestinal tract. *Food Funct* 2013; 4: 899–905.
38. Rodrigues-Esteves V, Sanchez-Rodriguez M, Garcia A, Gomez-Castro AG. Feed conversion rate and estimated energy balance of free grazing Iberian pigs. *Livestock Sci* 2010; 132: 152–6.
39. Pinna W, Cappai MG, Moniell G, Nieddu G. Tannins concentration and ultrastructural peculiarities of starch granules in acorns of *Quercus ilex*, *Quercus pubescens* Willd. and *Quercus ruber* L. In: Proceedings of the 11th Congress of the

- European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Leipzig, Germany,. 2007: 96.
40. Cappai MG, Wolf P, Dimauro C, Pinna W, Kamphues J. The bilateral parotidomegaly (hypertrophy) induced by acorn consumption in pigs is dependent on individual's age but not on intake duration. *Livestock Sci* 2014; 167: 263–8.
41. Carlson DM. Salivary proline-rich proteins: Biochemistry, molecular biology, and regulation of expression. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(3/4): 495–502.
42. Frandson RD, Wilke WL, Fails AD. Anatomy and physiology of farm animals. 7th ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2009: p. 356.
43. Øystein A. Boar tain related compounds: Androstenone/skatole/other substances. *Acta Vet Scand* 2006; 48(Supl I): S5.
44. Bee G, Silacci P, Ampuero-Kragten S, et al. Hydrolysable tannin-based diet rich in gallotannins has a minimal impact on pig performance but significantly reduces salivary and bulbourethral gland size. *Animal* 2016; published online.
45. Mehansho HS. Clement BT. Smith SS, Carlson DM. Induction of Proline-Rich Glycoprotein Synthesis in Mouse Salivary Glands by Isoproterenol and by Tannins. *J Biol Chem* 1985; 260: 4418–23.
46. Ann DK, Clement SE, Johnstones M, Carlson DM. Induction of Tissue-Specific Proline-Rich Protein Multigene Families in Rat and Mouse Parotid Glands by Isoproterenol. *J Biol Chem* 1987; 262: 899–904.

9 PRILOGE

PRILOGA I – Pufri in raztopine.

RAZTOPINE ZA TRIKROMNO BARVANJE PO GOLDNERJU

1. RED 2G C₁₈H₁₃N₃Na₂O₈S₂, M = 509.415 g/mol (Merck)
2. Fosfovolframova kislina z barvilkom Orange G H₃[P(W₂O₁₀)₄] x H₂O,
M = 2.880,2 g/mol (Merck)
3. Light green SF C₂₆H₃₃Cl₂N₃, M = 458.471 g/mol (Merck)

RAZTOPINE ZA IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE

1. Natrijev citratni pufer C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O, M = 284,10 g/mol (Sigma Aldrich)

Uporabljali smo 0,01 M raztopino s pH 6.

PRILOGA II – Kemikalije in oprema.

Abcam	Cambridge, VB
Abgent	San Diego, Kalifornija, ZDA
Dako	Glostrup, Danska
Leica TCS NT	Heidelberg, Nemčija
Merck	Darmstadt, Nemčija
Roche	Basel, Švica
Sigma Aldrich	Taufkirchen, Nemčija
Santa Cruz Biotechnology	Texas, ZDA
Nikon	Melville, ZDA
Whirpool	Ljubljana, Slovenija

PRILOGA III – Publikacije in prezentacije.

1. Rutar M, Brankovič J, Fazarinc G, Škrlep M, Batorek Lukač N, Čandek-Potokar M, Kubale V. Influence of different concentrations of hydrolysable tannins on salivary glands in boars. *Abstract book*, 8th meeting of the young generation of veterinary anatomists (YGVA), 15-17 July 2015, Poznań, Poland: Faculty of veterinary medicine and animal science, 2016, str. 43. [COBISS.SI-ID 4018810] (poster)

2. Rutar M, Brankovič J, Fazarinc G, Škrlep M, Batorek Lukač N, Čandek-Potokar M, Kubale V. Different concentrations of hydrolysable tannins fed to entire males affect salivary glands. *Proceedings of the 6th International Scientific Meeting*, Days of veterinary medicine 2015, 24-26 September 2015, Struga. Suplement, vol 38, suppl. 1; 2015, str 38, P6. [COBISS.SI-ID 4074618] (poster)