



**UDRUŽENJE VETERINARA  
PRAKTIČARA SRBIJE**



**DEPARTMAN ZA VETERINARSKU  
MEDICINU-POLJOPRIVREDNI  
FAKULTET NOVI SAD**

# **ZDRAVSTVENA ZAŠTITA I REPRODUKCIJA ŽIVOTINJA**

**ZBORNİK RADOVA**

**Novi Sad, Online Webinar, 17-23.10.2020.godine**



**Održavanje skupa podržao je  
Pokrajinski sekretarijat za visoko  
obrazovanje i naučno-istraživačku  
delatnost AP Vojvodine**

## **ZDRAVSTVENA ZAŠTITA I REPRODUKCIJA ŽIVOTINJA-ZBORNİK RADOVA**

Datum održavanja:

**17-23.10.2020.**

Organizatori:

**Udruženje veterinara praktičara Srbije i Departman za veterinarsku medicinu Novi Sad**

Izdavač:

**Poljoprivredni fakultet Novi Sad**

Za izdavača:

**Prof.dr Nedeljko Tica, dekan**

Urednik zbornika:

**Prof.dr Marko Cincović**

CIP - Каталогизација у публикацији  
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

636.082.4(082)

636:619(082)

**ZBORNİK [sa skupa] "Zdravstvena zaštita i reprodukcija životinja" : 17-23.10.2020. /**  
[urednik Marko Cincović]. - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2020 (Beograd : Donatgraf). -  
173 str. : ilustr. ; 25 cm

Tiraž 500. - Bibliografija uz svaki rad. - Rezime na engl. jeziku uz svaki rad.

ISBN 978-86-7520-490-9

а) Домаће животиње - Здравствена заштита - Зборници б) Домаће животиње -  
Репродукција - Зборници

COBISS.SR-ID 20563721

## PROGRAMSKI ODBOR

Prof.dr Marko Cincović, predsednik

Prof.dr Branislava Belić, Prof.dr Nikolina Novakov, Prof.dr Romeo Teodor Cristina, prof.dr Radojica Đoković, Prof.dr Jože Starič, Prof.dr Dragica Stojanović, Prof.dr Bojan Toholj, Prof.dr Ramiz Ćutuk, Doc.dr Jožica Ježek, Prof.dr Aleksandar Potkonjak, Prof.dr Marko Pećin, Doc.dr Andrija Musulin, Doc.dr Mihajlo Erdeljan, Prof.dr Nada Plavša, Prof.dr Božidar Savić, Prof.dr Ivan Stančić, Prof.dr Ivana Davidov, Prof.dr Plamen Trojačanec, Prof.dr Miodrag Radinović, prof.dr Mario Kreszinger, Doc.dr Ognjen Stevančević, Doc.dr Nenad Stojanac, Prof.dr Zdenko Kanački, Prof.dr Slobodan Stojanović, Doc.dr Marija Pajić, Doc.dr Stanislav Simin, Doc.dr Zorana Kovačević.

## ORGANIZACIONI ODBOR

Dr vet.med.spec. Bojan Blond, predsednik

dr sc. Mira Majkić, dr vet. med. Miloš Jovičić, dr vet. med. spec. Vladimir Ćitaković, dr vet. med. Saša Marković, dr vet. med. Zoran Knežević, dr vet. med. Goran Đmura, dr vet. med. spec. Ivan Jeremić, dr vet. med spec. Marko Katić.



**PRIJATELJI UDRUŽENJA VETERINARA PRAKTIČARA SRBIJE U 2020 GODINI**

**PROMEDIA**

**SUPERLAB**

**ZOETIS**

**VETERINARSKI ZAVOD SUBOTICA**

**GEBI**

**BIOCHEM BALKAN**

**BOEHRINGER INGELHEIM SERBIA**

**NUSCIENCE PREMIX INTERNATIONAL**

**MARLO FARMA**

**BAYER**

**VIRBAC**

**PRO FEED-2013**

**DE HEUS**

**EKO HEMIJA**

Zbog pandemije COVID19 tačan program, satnica i raspored predavanja objavljen je na sajtu organizatora i na e-mailove prijavljenih učesnika u nedelji održavanja.

## SADRŽAJ

DVADESET GODINA DEPARTMANA ZA VETERINARSKU MEDICINU U NOVOM SADU 2000-2020 – SVRHA, CILJEVI I ISHODI UČENJA PREMA NACIONALNIM STANDARDIMA KVALITETA – Branislava Belić, Marko R. Cincović, Nikolina Novakov.....	7
KVALITET E-UČENJA NA DALJINU – Marko R. Cincović, Branislava Belić.....	15
ULOGA VETERINARA U ODRŽIVOJ STOČARSKOJ PROIZVODNJI U MLEČNOM GOVEDARSTVU DANAS – Bojan Blond.....	20
KLINIČKO-PATOLOŠKI NALAZ KOD BABEZIOZE PASA – Nikolina Novakov, Jankov Milica, Ivana Lakić, Sandra Nikolić.....	27
PRIMENA HEMOKULTURE U KONTROLI KVALITETA KRVI OVNOVA ZA SPRAVLJANJE MIKROBIOLOŠKIH PODLOGA Aleksandar Potkonjak, Marko R. Cincović, Branislava Belić, Ivana Lakić.....	33
RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KOD FARMSKIH ŽIVOTINJA Zorana Kovačević, Miodrag Radinović.....	40
UTICAJ FAKTORA SREDINE NA KVALITET VAZDUHA U OBJEKTIMA ZA SMEŠTAJ GOVEDA – Mira Majkić, Nada Plavša, Branislava Belić, Ivana Lakić.....	45
ISCRPLJENOST TERMOREGULACIONOG SISTEMA KAO POSLEDICA HRONIČNOG TOPLIČNOG STRESA – Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Slobodan Stojanović, Srđan Todorović, Slavoljub Jović.....	52
ISPITIVANJE REFERENTNIH VREDNOSTI KRVNIH PARAMETARA KOD PASA – Ivana Lakić, Branislava Belić, Sandra Nikolić.....	57
ETIOPATOGENEZA, DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KOD KUJA – vSandra Nikolić, Branislava Belić, Ivana Davidov, Bojan Toholj, Ivana Lakić.....	64
ZNAČAJ NEESTERIFIKOVANIH MASNIH KISELINA (NEFA) U PROCENI METABOLIČKOG STATUSA KRAVA U RANOJ LAKTACIJI – Jovan Stanojević, Miodrag Radinović, Marko Cincović, Branislava Belić.....	75
BIOHEMIJSKE ANALIZE KRVI KAO INDIREKTNA METODA DIJAGNOSTIKE SUBKLINIČKE HROMOSTI KONJA – Tijana Kukurić, Mihajlo Erdeljan.....	81

HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA I JEDINJENJA SA ANTIHELMINTČKIM POTENCIJALOM – Filip Štrbac, Dragica Stojanović, Radomir Ratajac.....	88
METABOLIZAM SLOBODNIH MASNIH KISELINA, HOLESTEROLA, TRIGLICERIDA I LIPOPROTEINA KOD KRAVA – Radojica Đoković, Marko R. Cincović.....	96
INFLAMACIJA, OKSIDATIVNI STRES I KETOZA KOD KRAVA – Biljana Delić Vujanović, Branislava Belić, Radojica Đoković, Nenad Staničkov, Siniša Grubač, Kosta Petrović.....	100
UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA RAZVOJ INFLAMACIJE I METABOLIZAM HOLESTEROLA KOD KRAVA U RANOJ LAKTACIJI –Kosta Petrović, Dragica Stojanović, Taliya Hristovska, Filip Štrbac.....	105
REFERENTNI VREDNOSTI KRVNIH PARAMETARA KOD MLEČNIH KRAVA – Kovačević Vanja, Marko Cincović, Branislava Belić, Radojica Đoković, Kovačević Danijel, Ivana Lakić, Nenad Staničkov, Siniša Grubač.....	111
BIOHEMIJSKE PROMENE U KRVI I OSTALIM TELESNIM TEČNOSTIMA U POSTMORTALNOM PERIODU – Nenad Staničkov, Ivana Davidov, Marko Cincović, Branislava Belić, Ivana Lakić.....	117
PRIMENA SINTETSKIH I PRIRODNIH PROSTAGLANDINA POSLE TELJENJA I POJAVA ENDOMETRITISA KOD KRAVA SA ZAOSTALOM POSTELJICOM – Srđan Todorović, Ivan Stančić, Ivan Galić, Ružić Zoran, Ivana Lakić.....	127
SREDNJELANČANE MASNE KISELINE U ZAŠTITI KRAVA OD MASTITISA – Srđan Krnjaić.....	135
PATOFIZIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA I INTEPRETACIJA LABORATORIJSKIH PARAMETARA U KRVI ŽIVOTINJA (Radionica) – Marko R. Cincović.....	140
APARAT ZA INHALACIONU ANESTEZIJU – BEZBEDNA UPOTREBA (Radionica) – Bojan Toholj, Jovan Spasojević.....	155
PRIMENJEMA VETERINARSKA EPIDEMIOLOGIJA (Radionica) – Aleksandar Potkonjak.....	158
RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KOD FARMSKIH ŽIVOTINJA (Radionica) – Miodrag Radinović, Zorana Kovačević.....	163

## **DVADESET GODINA DEPARTMANA ZA VETERINARSKU MEDICINU U NOVOM SADU 2000-2020 – SVRHA, CILJEVI I ISHODI UČENJA PREMA NACIONALNIM STANDARDIMA KVALITETA**

Branislava Belić, Marko R. Cincović, Nikolina Novakov

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad  
Autor za kontakt: [drbbelic@gmail.com](mailto:drbbelic@gmail.com)*

### **Apstrakt**

Departman za veterinarsku medicinu osnovan je 2000. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Organizovan je kao jedinstvena celina i objedinjava poslove nastave, zdravstvene zaštite životinje, naučno-istraživačkog rada i edukacije veterinarskih kadrova. U skladu sa Zakonom o visokom obrazovanju, neophodno je u redovnim vremenskim razmacima vršiti spoljašnju proveru kvaliteta visokoškolske ustanove i studijskih programa, što se naziva akreditacija. Akreditacijom se procenjuje ispunjenost standarda kvaliteta u visokom obrazovanju. Standardi kvaliteta koje bi trebali da pročitaju i razumeju svi budući studenti i njihovi roditelji, sadašnji studenti, bivši studenti i doktori veterinarske medicine jesu svrha, ciljevi i ishodi studijskih programa. Ovi standardi na najkraći način opisuju zbog čega se realizuje neki studijski program, šta on znači pojedincu i društvu u celini, na koji način se realizuje i šta će studenti znati i umeti da urade po završetku studija. Ovi standardi moraju biti u skladu sa nacionalnim i međunarodnim propisima u oblasti veterinarske delatnosti i veterinarskog visokoškolskog obrazovanja, čime se stiču uslovi za dobijanje validnih i priznatih diploma doktora veterinarske medicine. Cilj ovog rada je da predstavi svrhu, ciljeve i ishode studijskih programa inegriranih, specijalističkih i doktorskih studija veterinarske medicine koji se već dve decenije realizuju na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Ključne reči: veterinarsko obrazovanje, kvalitet, standardi.

### **Abstract**

The Department of Veterinary Medicine was founded in 2000 at the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad. It is organized as a single unit and integrates teaching, animal health care, scientific research and education of veterinary personnel. In accordance with the Law on Higher Education, it is necessary to carry out, at regular intervals, an external quality review of a higher education institution and study programs, called accreditation. Accreditation assesses the fulfillment of quality standards in higher education. The quality standards that should be read and understood by all prospective students and their parents, current students, alumni and veterinary doctors are the purpose, goals and outcomes of the study programs. These standards briefly describe why a study program is implemented, what it means to the individual and society as a whole, how it is implemented, and what students will know and be able to do upon graduation. These standards must be in accordance with national and international regulations in the field of veterinary and veterinary higher education, thus creating the condition for obtaining valid and recognized degrees of veterinary doctors. The aim of this paper is to present the purpose, goals and outcomes of the study programs of integrated, specialist and doctoral studies in veterinary medicine, which have been implemented at the Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad for two decades.

Key words: veterinary education, quality, standards.

### **Akreditacijna visokoškolskih ustanova i studijskih programa – standardi kvaliteta**

Akreditacija je postupak spoljašnje provere kvaliteta visokoškolskih ustanova i studijskih programa. Ona se obavlja posebno za ustanovu, a posebno za svaki studijski program. Zakon o visokom obrazovanju (2018) definiše sledeće: “Radi obavljanja poslova akreditacije, provere kvaliteta visokoškolskih ustanova i jedinica u njihovom sastavu, vrednovanja studijskih programa i obezbeđivanja kvaliteta u visokom obrazovanju Vlada obrazuje Nacionalno akreditaciono telo. Nacionalno akreditaciono telo ima svojstvo pravnog lica. Nacionalno akreditaciono telo finansira se iz prihoda od naknada za akreditaciju i proveru kvaliteta visokoškolskih ustanova i jedinica u njihovom sastavu, vrednovanja studijskih programa i obezbeđivanja kvaliteta u visokom obrazovanju i iz drugih prihoda u skladu sa zakonom. Nacionalno akreditaciono telo podnosi Vladi izveštaj o svom radu najmanje jedanput godišnje, a izuzetno i na zahtev Nacionalnog saveta i Ministarstva.

U cilju akreditacije, visokoškolska ustanova mora da pripremi obimnu dokumentaciju u skladu sa standardima za akreditaciju studijskih programa i ustanove. Standardi za akreditaciju studijskih programa prvog i drugog stepena visokog obrazovanja podeljeni su u 11 standarda i to: Standard 1-Struktura studijskog programa; Standard 2- Svrha studijskog programa; Standard 3- Ciljevi studijskog programa; Standard 4- Kompetencije diplomiranih studenata; Standard 5- Kurikulum; Standard 6- Kvalitet, savremenost i međunarodna usaglašenost studijskog programa; Standard 7- Upis studenata; Standard 8- Ocenjivanje i napredovanje studenata; Standard 9- Nastavno osoblje; Standard 10- Organizaciona i materijalna sredstva i Standard 11- Kontrola kvaliteta.

U ovom radu ćemo predstaviti standarde 2, 3 i 4 koji su od velikog značaja jer moraju biti povezani sa drugim propisima i zakonima koji regulišu veterinarsku profesiju, a sa druge strane moraju biti povezani sa misijom i vizijom visokoškolske ustanove koja obrazuje veterinarski kadar.

Svrha studijskog programa, ciljevi programa i ishodi (kompetencije studenata) definisana je Pravilnikom o standardima i postupku za akreditaciju studijskih programa. Svrha studijskog programa je obrazovanje studenata za prepoznatljive i jasne profesije i zanimanja. Studijski program obezbeđuje sticanje kompetencija koje su društveno opravdane i korisne. Svrha studijskog programa mora biti u skladu sa osnovnim ciljevima visokoškolske ustanove na kojoj se program izvodi. Svrha realizacije studijskog programa mora biti jasno i nedvosmisleno formulisana. Ciljevi studijskog programa uključuju postizanje kompetencija i akademskih veština kao i metode za njihovo sticanje. Ciljevi takođe mogu da uključe razvoj kreativnih sposobnosti i ovladavanje specifičnim praktičnim veštinama potrebnim za obavljanje profesije. Ciljevi studijskog programa su u skladu sa osnovnim zadacima i ciljevima visokoškolske ustanove na kojoj se program izvodi. Ciljevi realizacije studijskog programa moraju da budu jasno i nedvosmisleno formulisani. Ciljevi se usklađuju sa zahtevima određene oblasti i tržišta rada, privrednog razvoja i definisanim kvalifikacijskim okvirom. Ishodi učenja definisani su kroz bliži opis standarda koji podrazumeva sticanje opštih sposobnosti i predmetno-specifičnih sposobnosti a shodno nacionalnom okviru kvalifikacija. Savladavanjem studijskog programa student stiče sledeće opšte sposobnosti:analize, sinteze i predviđanja rešenja i posledica; ovladavanja metodima, postupcima i procesima istraživanja; razvoja kritičkog i samokritičkog mišljenja i pristupa;primene znanja u praksi; razvoja komunikacionih sposobnosti i spretnosti, kao i saradnje sa užim socijalnim i međunarodnim okruženjem; profesionalne etičnosti. Savladavanjem studijskog programa student stiče sledeće predmetno-specifične sposobnosti: temeljno poznavanje i razumevanje discipline odgovarajuće struke; rešavanja konkretnih problema uz upotrebu naučnih metoda i postupaka; povezivanja osnovnih znanja iz različitih oblasti i njihove primene; praćenja i primene novina u struci; razvoja veština i spretnosti u upotrebi znanja u odgovarajućem području; upotrebe informaciono-komunikacionih tehnologija u ovladavanju znanjima odgovarajućeg područja. Ishodi učenja se opisuju prema deskriptorima ishoda učenja nacionalnog okvira kvalifikacija.



### **Svrha, ciljevi i ishodi dodiplomskih integriranih studija veterinarske medicine**

*Svrha studijskog programa dodiplomskih, integriranih studija veterinarske medicine* – Svrha studijskog programa integriranih akademskih studija veterinarske medicine je obrazovanje omnikompetentnih doktora veterinarske medicine, koji su deo veterinarske profesije koja je prepoznatljivo i jasno zanimanje i profesija. Osnovna svrha studijskog programa je školovanje stručnjaka za direktno uključivanje u različite grane i oblike zdravstvene zaštite domaćih i gajenih životinja i kontrole zdravlja i bezbednosti proizvoda poreklom od životinja. Veterinarsko zanimanje i profesija organizuju se u okviru medicinskog polja Univerziteta i definisani su Zakonom i veterinarstvu i zakonom o regulisanim profesijama. Svrha studijskog programa je da obezbedi društveno koriste kompetence koje su definisane Zakonom o veterinarstvu i to: 1) praćenje, zaštitu i unapređenje zdravlja životinja; 2) zaštitu životinja od zaraznih i drugih bolesti; 3) otkrivanje i dijagnostikovanje bolesti i lečenje obolelih životinja; 4) sprovođenje mera zdravstvene zaštite životinja; 5) zaštitu ljudi od zoonoza; 6) kontrolu bezbednosti hrane životinjskog porekla i proizvoda životinjskog porekla na mestu uzgoja životinja, proizvodnje i prometa proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje; 7) obeležavanje i registraciju životinja radi kontrole kretanja i obezbeđivanja sledljivosti u proizvodnji i prometu životinja, proizvoda životinjskog porekla i hrane životinjskog porekla; 8) kontrolu vode za napajanje životinja radi obezbeđivanja njene ispravnosti; 9) kontrolu zdravlja priplodnih životinja i njihove reproduktivne sposobnosti, kao i sprovođenje mera za lečenje steriliteta i veštačkog osemenjavanja; 10) zaštitu životne sredine od zagađenja uzročnicima zaraznih bolesti životinja; 11) zaštitu životinja od mučenja i patnje, kao i staranje o dobrobiti životinja; 12) kontrolu u proizvodnji i prometu veterinarskih lekova i medicinskih sredstava za upotrebu u veterinarskoj medicini; 13) poslove dezinfekcije, dezinfekcije, deratizacije, dezodoracije i dekontaminacije; 14) veterinarsku edukaciju i obaveštavanje. Svrha studijskog programa integriranih akademskih studija Veterinarske medicine je da pruži sva potrebna znanja i veštine koja su neophodna za očuvanje zdravlja životinja i namirnica animalnog porekla, budući da su studenti odgovarajućim metodama nastave i učenja kvalifikovani za kreativni i inovativni rad, praćenje stručne literature, prikupljanje i obradu podataka; timski rad, kao i uspešno korišćenje znanja i veština u veterinarskoj medicini. Pored navedenog, svrha studijskog programa je da obezbedi pripremanje studenata za aktivno građanstvo i buduću karijeru, podršku njihovom ličnom razvoju, stvaranje široke baze naprednih znanja i podsticanje naučnog rada i inovacija. Stručnjaci ovog profila mogu se zapošljavati u okviru veterinarskih subjekata (veterinarske ambulante, stanice i klinike), veterinarskih laboratorija (mikrobiološke, laboratorije za analizu stične hrane, kliničke laboratorije i drugo), subjekata veterinarskog obrazovanja i istraživanja (srednje škole, fakulteti, instituti, zavodi) i u okviru veterinarske inspekcije, Uprave za veterinu i drugim regulatornim veterinarskim telima. Pored navedenog svrha studijskog programa je da obezbedi kompetence kako bi se svršeni studenti zaposlili u okviru preduzeća koji se bave: govedarskom, ovčarskom, kozarskom, svinjarskom, živinarskom i konjarskom proizvodnjom; lovnom privredom, proizvodnjom i preradom stočne hrane, zatim u farmaceutskoj industriji, u specijalizovanim veletrgovinama veterinarskih lekova, opreme itd. Da bi se upravljalo veterinarskom delatnošću na uspešan način studenti moraju biti edukovani na odgovarajući način, pa je svrha studijskog programa da obezbedi odgovarajuće kombinacije teorijskog znanja i praktične delatnosti iz svih grana veterinarske medicine.

*Cilj integriranih studija veterinarske medicine* – Cilj integriranih studija veterinarske medicine je da omogućiti studentima sticanje najnovijih naučnih i stručnih znanja i veština iz oblasti veterinarske medicine. Drugi značajan cilj je kontinuirani sveobuhvatni razvoj svih aspekata veterinarske struke zasnovan na modernim principima i standardima. Studijski program pruža mogućnosti za sticanje vrlo raznovrsnih praktičnih znanja i veština iz svih grana i oblasti veterinarske medicine, koji su definisali EU direktivama, EAEVE standardima i nacionalnim Zakonom o regulisanim profesijama i podrazumevaju sledeće: 1) primereno poznavanje nauke na kojoj se zasniva delatnost doktora veterinarske medicine i propisa Evropske unije koji se odnose na te delatnosti; 2) primereno poznavanje građe organizma, ponašanja i fizioloških funkcija životinja i kompetencije potrebne za njihov gajenje, hranjenje, dobrobit, reprodukciju i higijenu uopšte; 3) kliničke, epidemiološke i analitičke kompetencije potrebne za

prevenciju, dijagnostiku i lečenje bolesti životinja, uključujući anesteziju, aseptične operacije i bezbolnu smrt, bilo pojedinačno ili u grupama, uključujući posebno poznavanje bolesti prenosivih na ljude;4) primereno poznavanje preventivne medicine, uključujući i poznavanje postupaka koji se odnose na zahteve i sertifikovanje;5) primereno poznavanje higijene i tehnologije za proizvodnju, izradu i stavljanje u promet hrane za životinje ili hrane životinjskog porekla, namenjene ishrani ljudi, uključujući kompetencije potrebne za razumevanje i objašnjavanje dobre prakse u tom području;6) primerena znanja i veštine potrebne za odgovornu i razumnu upotrebu veterinarskih lekova radi lečenja životinja i obezbeđivanje sigurnosti prehrambenog lanca i zaštite okoline. Cilj studijskog programa je da stečena znanja i veštine studenti mogu koristiti za svoje dalje stručno usavršavanje, kao i za završavanje viših stepena stručnog i naučnog obrazovanja, kao što su specijalističke i doktorske studije. Cilj studijskog programa je da omogući sticanje kompetenci kroz zakonom definisana naučna u stručna polja koja se moraju izučavati u okviru integrisanih studija i to su: Fizika, Hemija, Biologija životinja, Biologija biljaka, Biomatematika; Osnovne nauke: Anatomija (uključujući histologiju i embriologiju), Fiziologija, Biohemija, Genetika, Farmakologija, Farmacija, Toksikologija, Mikrobiologija, Imunologija, Epidemiologija, Profesionalna etika; Kliničke nauke: (Porodiljstvo, Patologija, Parazitologija, Klinička medicina, hirurgija, anesteziologija, Klinička predavanja o različitim domaćim životinjama, peradi i drugim životinjskim vrstama, Preventivna medicina, Radiologija, Reprodukcija i poremećaji reprodukcije, Veterinarsko javno zdravstvo, Veterinarsko zakonodavstvo i forenzična medicina, Terapeutika, Propedeutika); Proizvodnja životinja (Proizvodnja životinja, Ishrana životinja, Agronomija, Ruralna ekonomija, Uzgoj životinja, Veterinarska higijena, Etologija i zaštita životinja; Higijena hrane: Inspekcijski nadzor i kontrola hrane za životinje ili hrane životinjskog porekla, Higijena i tehnologija hrane), Praksa. Ciljevi će se ostvarivati uz postepeni prolazak studenta kroz izučavanje svih naučnih i stručnih polja, primenom modernih interaktivnih metoda nastave i učenja, usmeravanjem ka aktivnom i kreativnom učenju, usmeravanjem ka sticanju praktičnog i aplikativnog, umesto čisto teorijskog znanja, što će sve doprineti kontinuiranom poboljšanju efikasnosti studiranja. Usmerenost ka osposobljavanju studenata za samostalni rad u veterinarskoj struci se ogleda prvenstveno preko ponude individualnog izbora predmeta, i ranog izlaganja studenata realnom praktičnom radu kroz rad sa pacijentima i uzorcima pod nadzorom nastavnika. Ciljevi studijskog programa su konkretni, ostvarivi s obzirom na raspoložive resurse, i bliže definišu misiju i ciljeve naše ustanove.

*Ishodi (kompetencije studenata po diplomiranju – Opis opštih i predmetno-specifičnih kompetencija studenata (najviše 200 reči):* Doktor veterinarske medicine treba da: Opiše, obrazloži, utvrdi i kritički oceni strukturu i funkciju zdravih životinja i njihovog odgajanja; etiologiju, patogenezu, kliničke znakove, dijagnozu i tretman uobičajenih bolesti; zakone koji se tiču zdravstva životinja (uključujući transport) i bolesti koje po zakonu moraju da se prijave; Efikasno komunicira sa klijentima, javnošću, kolegama i odgovornim vlasnicima; Priprema jasne izveštaje o pacijentima i održava evidenciju o pacijentima u obliku koji zadovoljava kolege i koji je jasan javnosti; Radi efikasno kao deo multidisciplinarnog tima; Procenjuje ekonomske i emotivne uslove u kojima veterinar radi, i izabira odgovarajući način reakcije na pritiske koji se javljaju u datim uslovima; Prikuplja, stvara i unapređuje veterinarsko znanje i deluje za dobrobit veterinarske prakse; daje analize i procene o sopstvenim odgovornostima i odgovornostima poslodavca u vezi sa zaposlenjem i zdravljem; Primenjuje pravila bezbednog rada, odnos sa osobljem i odgovornost pred javnošću; Primenjuje osnovne ekonomske principe i obračunava pravilno troškove; Efikasno koristi informacione tehnologije u cilju komunikacije, deljenja, prikupljanja, manipulisanja i analize informacija; uvažava i vrednuje potrebu i profesionalnu obavezu da se posveti trajnoj obuci i edukaciji i profesionalnom razvoju tokom svog profesionalnog života; da primenjuje etičke kodove odgovarajućih regulatornih tela; da bude svestan ličnih granica i da pokaže svest o tome kada, gde i od koga traži profesionalni savet, pomoć i podršku; da koristi istraživačke metode i principe medicine zasnovane na činjenicama; da primenjuje stečena znanja u praksi. Diplomirani doktor veterinarske medicine po završetku studijskog programa poseduje sledeće veštine: Da sastavi tačnu i bitnu istoriju pojedinačne životinje ili grupe životinja i njene/njihove okoline; Da upravlja i obuzdava životinju bezbedno i humano i da poučava druge da primenjuju ove tehnike; Da izvrši kompletan klinički pregled; Da vodi brigu o svim uobičajenim vrstama domaćih životinja u hitnim slučajevima i da ume da

pruži prvu pomoć; Da proceni tačno nutricionisti status životinje i da može da posavetuje klijenta kako da vodi brigu i uzgaja životinju i kako da je hrani; Da ume da uzme, očuva i transportuje uzorke, izvrši standardne laboratorijske testove i da očita rezultate testova koji su obavljani u domaćim uslovima, kao i onih koje su obavile druge laboratorije; Da koristi rendgenski aparat, aparat za ultrazvuk i drugu tehničku opremu koje može da se koristi kao dijagnostička pomoć, bezbedno i u skladu sa aktuelnim regulativama; Da poštuje proceduru kada su u pitanju zoonoze i bolesti koje zahtevaju prijavljivanje i izveštaj; Da zna da obavi sertifikaciju; Da zna da proceni odgovarajuće izvore podataka o licenciranim lekovima, da prepíše ili da lekove pravilno i odgovorno u skladu sa zakonom i da bude siguran da su lekovi i otpad bezbedno smešteni ili bačeni; Da predloži i primeni određenu terapiju; Pravilno primeni principe sterilizacije hirurške opreme i primenjuje principe aseptične hirurgije; Bezbedno izvrši sedaciju, totalnu i lokalnu anesteziju i da primeni kontrolu bola; Da ume da prepozna kada je neophodna eutanazija i da je izvrši humano te da posavetuje o odstranjivanju leša; Da zna da izvrši osnovni post mortem pregled, zabeleži detalje, uzorkuje tkivo, skladišti ga i transportuje; Da zna da izvrši ante i post mortem inspekciju životinja za prehranu i tačno identifikuje uslove koji utiču na kvalitet i bezbednost produkta animalnog porekla; Da zna da oceni i implementira osnovne zdravstvene i socijalne podatke; Da predloži i formira preventivne i profilaktičke programe prilagođene vrsti životinje; Da minimalizuje rizik od kontaminacije širenja infekcije i skupljanja patogena u veterinarskim prostorijama i polju.

### **Svrha, ciljevi i ishodi specijalističkih akademskih studija veterinarske medicine**

*Svrha studijskog programa specijalističkih studija* – Svrha studijskog programa je obrazovanje studenata za prepoznatljivu i jasnu profesiju i zanimanje doktor veterinarske medicine-specijalista, koji po sticanju ove diplome stiču kompetencije i pravo upisa na uže specijalističke studije koje prepoznaje Zakon o veterinarstvu, a propisuje Uprava za veterinu. Studijski program obezbeđuje sticanje kompetencija koje su društveno opravdane i korisne, a koje su definisane Zakonom o veterinarstvu i podrazumeva da su doktori veterinarske medicine-specijalisti stručnjaci sa produbljenim znanjem i veštinama da vrše sledeće poslove: praćenje zaštite i unapređenje zdravlja životinja; zaštitu životinja od zaraznih i drugih bolesti; otkrivanje i dijagnostikovanje bolesti i lečenje obolelih životinja; sprovođenje mera zdravstvene zaštite životinja; zaštitu ljudi od zoonoza; kontrolu bezbednosti hrane životinjskog porekla i proizvoda životinjskog porekla na mestu uzgoja životinja, proizvodnje i prometa proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje; obeležavanje životinja radi kontrole kretanja o obezbeđivanja praćenja u proizvodnji i prometu životinja, proizvoda životinjskog porekla i hrane životinjskog porekla; kontrolu vode za napajanje životinja radi obezbeđivanja njene ispravnosti; kontrolu zdravlja priplodnih životinja i njihove reproduktivne sposobnosti, kao i sprovođenje mera za lečenje steriliteta i veštačkog osemenjavanja; zaštitu životne sredine od zagađenja uzročnicima zaraznih bolesti životinja; zaštitu životinja od mučenja i patnje, kao i staranje o dobrobiti životinja; kontrolu u proizvodnji i prometu veterinarskih lekova i medicinskih sredstava za upotrebu u veterinarskoj medicini; poslove dezinfekcije, dezinfekcije, deratizacije, dezodoracije i dekontaminacije; veterinarsku edukaciju i obaveštavanje. Svrha studijskog programa je u skladu sa osnovnim ciljevima visokoškolske ustanove na kojoj se program izvodi.

*Ciljevi specijalističkih akademskih studija* – Program specijalističkih akademskih studija veterinarske medicine ima sledeće ciljeve: Da stečena znanja i iskustva, budu logična nadogradnja njihovog obrazovanja koje je stečeno na integrisanim studijama. Da se omogući produbljeno usvajanje znanja i veština u okviru oblasti i predmeta specifičnih za različite vidove specijalizacije definisane kroz Zakon o veterinarstvu i Evropski sistem veterinarske specijalizacije. Da su osposobljeni za visokostručni neposredan rad u zdravstvenoj zaštiti životinja. Osposobljenost studenta da, u uslovima svakodnevne prakse, profesionalno primenjuje savremene i efikasne tehnologije i metode u prevenciji, dijagnostici i terapiji. Da student stekne produbljena znanja i veštine, koje će mu omogućiti da povećava efikasnost rada na poslovima zdravstvene zaštite životinja i kontrole namirnica animalnog porekla. Da je sposoban za planiranje i praktičnu organizaciju održive zdravstvene zaštite životinja, uz očuvanje životne sredine. Da se formiraju stručnjaci koji mogu aktivno i efikasno pratiti sva savremena dostignuća i, njihovom

primenom u praksi, dalje razvijati i unapređivati efikasnost zdravstvene zaštite životinja. Da ovi stručnjaci budu sposobni da svoja znanja prenose drugima i da, na taj način, utiču na proširivanje efikasne i ekonomične zdravstvene zaštite životinja. Da studenti razviju sposobnosti timskog rada. Da završeni studenti mogu samostalno primenjivati i razvijati nove postupke i metode u veterinarskoj medicini. Da stečena znanja i veštine mogu koristiti za svoje dalje stručno usavršavanje, kao i za završavanje viših stepana stručnog i naučnog obrazovanja, kao što su uže specijalističke studije, shodno zakonu o veterinarstvu.

*Ishodi specijalističkih akademskih studija* - Kompetencije diplomiranih studenata definisane su u skladu sa Evropskom direktivom 36/2005/ES i propisanim veštinama i znanjima koje je propisala Evropska veterinarska federacija i Evropska asocijacija veterinarskih visokoškolskih ustanova (EAEVE). Kompetence studenata po završetku specijalističkih studija su sledeće: da sastavi tačnu i bitnu istoriju pojedinačne životinje ili grupe životinja i njene/njihove okoline, da pravilno koristi medicinsku dokumentaciju, da upravlja i obuzdava životinju bezbedno i humano i da poučava druge da primenjuju ove tehnike, da izvrši kompletan klinički pregled, da vodi brigu o svim uobičajenim vrstama domaćih životinja u hitnim slučajevima i da ume da pruži prvu pomoć (komentar: problemi koji se moraju umeti rešiti kod svake vrste životinja su: krvarenje, rane, teškoće u disanju, povrede oka i uha, nesvest, kliničko pogoršanje, opekotine, oštećenje tkiva, oštećenje unutrašnjih organa i zastoj rada srca, prva pomoć podrazumeva stavljanje zavoja, čišćenje rane, imobilisanje udova, veštačko oživljavanje i kontrolu krvarenja), da proceni tačno nutricionistički status životinje i da može da posavetuje klijenta kako da vodi brigu i uzgaja životinju i kako da je hrani, da ume da uzme, očuva i transportuje uzorke, izvrši standardne laboratorijske testove i da očita rezultate testova koji su obavljani u domaćim uslovima, kao i onih koje su obavile druge laboratorije, da koristi rendgenski aparat, aparat za ultrazvuk i drugu tehničku opremu koje može da se koristi kao dijagnostička pomoć, bezbedno i u skladu sa aktuelnim regulativama, da poštuje proceduru kada su u pitanju zoonoze i bolesti koje zahtevaju prijavljivanje i izveštaj, da zna da obavi sertifikaciju, da zna da proceni odgovarajuće izvore podataka o licenciranim lekovima, da prepíše ili da lekove pravilno i odgovorno u skladu sa zakonom i da bude siguran da su lekovi i otpad bezbedno smešteni ili bačeni, pravilno primeni principe sterilizacije hirurške opreme, pravilno primenjuje principe aseptične hirurgije, bezbedno izvrši sedaciju, totalnu i lokalnu anesteziju i da primeni kontrolu bola, da predloži i primeni određenu terapiju, da ume da prepozna kada je neophodna eutanazija i da je izvrši humano, koristeći odgovarajuće metode dok pokazuje razumevanje za osećanja vlasnika i drugih i obzir za bezbednost prisutnih; da posavetuje o odstranjivanju leša, da zna da izvrši osnovni post mortem pregled, zabeleži detalje, uzorkuje tkivo, skladišti ga i transportuje, da zna da izvrši ante i post mortem inspekciju životinja za prehranu i tačno identifikuje uslove koji utiču na kvalitet i bezbednost produkta animalnog porekla, da zna da oceni i implementira osnovne zdravstvene i socijalne podatke, da predloži i formira preventivne i profilaktičke programe prilagođene vrsti životinje (menadžment zdravlja stada), da napravi ravnotežu između prihvaćenih standarda zdravlja životinja, njihove dobrobiti i zdravlja ljudi i da traži savet i pomoć od kolega kada je neophodno, da minimalizuje rizik od kontaminacije širenja infekcije i skupljanja patogena u veterinarskim prostorijama i polju.

### **Svrha, ciljevi i ishodi doktorskih akademskih studija veterinarske medicine**

*Svrha doktorskih studija veterinarske medicine* – Svrha studijskog programa je da omogućiti studentima, da nakon završenih integrisanih studija, usavrše ranije znanje stečeno i da ovladaju metodama i postupcima naučno-istraživačkog rada iz oblasti za koju se opredele kroz izborne predmete i temu doktorske disertacije. Na ovaj način će doktoranti biti sposobni za samostalan i kvalitetan istraživački rad u skladu sa potrebama društva. Kroz ovakvo obrazovanje doktoranti će biti sposobni i da kritički procenjuju istraživački rad drugih, kao i da samostalno vode originalna i naučno relevantna istraživanja koja će omogućiti razvoj novih tehnologija i postupaka koji će doprinosti opštem razvoju društva. Pored toga, svrha ovog studijskog programa je i da pruži doprinos razvoju Poljoprivrednog fakulteta, jer će se doktoranti po pravilu uključivati u naučno istraživački rad na projektima koji se realizuju na Fakultetu.

Ovaj studijski program je koncipiran da obezbeđuje sticanje kompetencija koje su društveno opravdane, korisne i potrebne.

*Cilj doktorskih studija veterinarske medicine* – Cilj studijskog programa je obrazovanje i osposobljavanje doktoranata za naučno-istraživački rad primarno u naučnom polju medicinskih nauka i naučnoj oblasti veterinarske nauke. Student doktorand treba da stekne široko znanje i sistematsko razumevanje naučne oblasti veterinarskih nauka, kao i specifično znanje u određenoj naučnoj i užoj naučnoj disciplini veterinarske medicine iz koje se opredeli da sprovedi istraživanje za izradu doktorske disertacije. Cilj studijskog programa jeste da se doktorant kroz dva obavezna i osam izbornih predmeta pripremi i profiliše za izradu disertacije a veliki broj izbornih predmeta (59) omogućava studentu usmerenje na odabranu temu istraživanja. Cilj studijskog programa je i da doktorant bude sposoban da pregledom savremene naučne literature sagleda nivo naučnog saznanja iz oblasti odabrane doktorske disertacije, aktuelnost odabrane teme za istraživanje kao i dalje pravce razvoja i istraživanja. Pri tome, doktorand treba da bude sposoban da postavi naučnu hipotezu, da isplanira i izvrši istraživanje, odabere adekvatne metode, obradi rezultate istraživanja, kompetentno ih tumači, naučno i kritički ih analizira i izvodi logične zaključke. Cilj studijskog programa uključuje i razvoj kreativnih sposobnosti i ovladavanje specifičnim praktičnim veštinama potrebnim za budući razvoj karijere, razvoj sposobnosti za samostalan i timski rad, saopštavanje rezultata rada naučnoj, stručnoj i široj javnosti, kao i razvijanje svesti doktoranada za potrebom permanentnog obrazovanja.

*Ishod doktorskih studija veterinarske medicine* – Po završetku studijskog programa obrazuju se stručnjaci sa produbljenim znanjima sposobni za naučno-istraživački rad i primenu naučnih dostignuća i novih tehnologija u naučnoj oblasti medicinskih nauka - veterinarska medicina. Ishod procesa doktorskih studija programa Veterinarska medicina u naučnom polju medicinskih nauka - veterinarska medicina, jeste formiranje stručnjaka sa akademskim obrazovanjem koji poseduje značajno proširena i produbljena znanja u ovoj oblasti, naslonjeno na znanje i veštine stečene tokom Integriranih studija veterinarske medicine. Po uspešnom završetku programa doktorskih studija, stiče se naučni naziv doktor medicinskih nauka – veterinarska medicina koji pruža mogućnost rada u okviru izborne oblasti doktorskih studija, kao i u drugim oblastima veterinarske delatosti, uključujući rad na fakultetima i u istraživačkim institutima koji pripadaju medicinskom polju. Produbljeno znanje i razumevanje, kao i kompetencije stečene tokom doktorskih studija pružaju mogućnost za uspešno rešavanje složenih praktičnih i teorijskih problema u oblasti veterinarskih nauka. Po uspešnom završetku studija, doktori medicinskih nauka - veterinarska medicina, poseduju sledeće kompetencije: sposobnost sistematskog razumevanja nauke i struke u oblasti veterinarske medicine; ovladanost veštinama i metodama istraživanja u oblasti veterinarske medicine; sposobnost koncipiranja, projektovanja, primene i prilagođavanja toka istraživanja, odnosno rešavanja problema u različitim situacijama koje proističu tokom rada, pritom uz neophodan stepen akademskog integriteta; sposobnost kritičke analize, procene i sinteze novih i složenih ideja; sposobnost prenosa sopstvenih znanja, ideja i rezultata naučno-istraživačkog rada kolegama, širokoj akademskoj zajednici i društvu u celini; sposobnost da u akademskom i profesionalnom okruženju promovišu tehnološki napredak. Stečene kompetencije se verifikuju objavljivanjem naučnih radova i saopštenjima na naučnim skupovima, a proširuju kontinuiranim usavršavanjem tokom profesionalne karijere.

### **Zaključak**

Studijski program veterinarske medicine realizuje se na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. U skladu sa Zakonom o visokom obrazovanju, neophodno je u redovnim vremenskim razmacima vršiti spoljašnju proveru kvaliteta visokoškolske ustanove i studijskih programa, što se naziva akreditacija. Akreditacijom se procenjuje ispunjenost standarda kvaliteta u visokom obrazovanju. Standardi kvaliteta koje bi trebali da pročitaju i razumeju svi budući studenti i njihovi roditelji, sadašnji studenti, bivši studenti i doktori veterinarske medicine jesu svrha, ciljevi i ishodi studijskih programa. Ovi standardi na najkraći način opisuju zbog čega se realizuje neki studijski program, šta on znači pojedincu i društvu u celini, na koji način se realizuje i šta će studenti znati i umeti da urade po završetku studija. Ovi standardi moraju biti u skladu sa nacionalnim i

međunarodnim propisima u oblasti veterinarske delatnosti i veterinarskog visokoškolskog obrazovanja, čime se stiču uslovi za dobijanje validnih i priznatih diploma doktora veterinarske medicine. *Vivat Medicina Veterinaria Universitatis Studiorum Neoplantensis!*

### Literatura

1. Belić B., Cincović M., Lakić I. 2019. Unapređenje nastavnih metoda na predmetima iz oblasti patološke fiziologije na Departmanu za veterinarsku medicinu u Novom Sadu- predstavljanje projekta „PAFILAB“. Zbornik radova i kratkih sadržaja 30. savetovanja veterinara Srbije. Zlatibor 12-15. 09.
2. Burke J.W. 1989. *Competency based education and training*. The Falmer press, London-New York.
3. Cincović M.R., Belić B. 2018. Rangiranje univerziteta, naučno-istraživački i nastavni rad u polju Veterinarske medicine, *Letopis naučnih radova / Annals of agronomy, Pojoprivredni fakultet Novi Sad*, 42, 58-69.
4. Cincović M.R., Belić B., Stevančević M., Toholj B., Starić J., Smolec O., Čutuk R., Potkonjak A., Stojanac N., Stevančević O. 2015. Sistem kvaliteta u veterinarskom obrazovanju u Srbiji i EU – konstruktivno usaglašavanje kurikuluma. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*, 39(1) 108-120.
5. Cincović M.R., Starić J., Belić B., Ježek J. 2017. Klinička laboratorijska nastava u visokoškolskim veterinarskim ustanovama. Zbornik radova 28. Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor 7-10. septembar, str. 170-75.
6. Departman za veterinarsku medicinu – 18 godina u nastavi, nauci i privredi. Monografija i bibliografija. Cincović M.R. i Belić B. (ur.), str 1-50. Novi Sad, 2018.
7. Departman za veterinarsku medicinu sajt: <http://www.nsveterina.edu.rs/>, pristup 05.03.2020.
8. Despotović M. 2010. Razvoj kurikuluma u stručnom obrazovanju. *Filozofski fakultet, Univerzitet u Beogradu*.
9. DIRECTIVE 2005/36/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 7 September 2005 on the recognition of professional qualifications. *Official Journal of the European Union*
10. *Elaborat o opravdanosti osnivanja studijskog programa veterinarske medicine*, Novi Sad, 1999.
11. *Elaborat za akreditaciju studijskog programa doktorskih studija veterinarske medicine*, 2019
12. *Elaborat za akreditaciju studijskog programa integriranih studija veterinarske medicine*, 2019
13. *Elaborat za akreditaciju studijskog programa specijalističkih studija veterinarske medicine*, 2019
14. ESEVT SOP, 2019, Zagreb; Annex 2. List of subjects and Day One Competences.
15. *Final Recommendations of the 4th OIE Global Conference on Veterinary Education*
16. *OIE recommendations on the Competencies of graduating veterinarians ('Day 1 graduates') to assure National Veterinary Services of quality*
17. *Pravilnik o radu laboratorije za patološku fiziologiju departmana za veterinarsku medicinu*, aktuelna verzija u martu 2020.
18. *Pravilnik o radu veterinarske klinike*, aktuelna verzija u martu 2020.
19. *Pravilnik o samovrednovanju studija, pedagoškog rada nastavnika i uslova rada*, aktuelna verzija u martu 2020.
20. *Pravilnik o standardima i postupku za akreditaciju studijskih programa*, NAT, 2019.
21. *Pravilnik o standardima i postupku za akreditaciju visokoškolskih ustanova*, NAT, 2019.
22. *Statut Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu*, aktuelna verzija u martu 2020.
23. *Zakon o visokom obrazovanju*, 2018.

## **KVALITET E-UČENJA NA DALJINU**

Marko R. Cincović, Branislava Belić

Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Kontakt: [drbbelic@gmail.com](mailto:drbbelic@gmail.com)

### **Apstrakt**

Aktuelna epidemiološka situacija u vezi sa COVID19 i nove generacije studenata koje su skoro od rođenja u digitalnom okruženju, nameću pitanje uvođenja e-učenja kao neizostavnog didaktičkog sredstva. E-učenje ili online učenje ili učenje na daljinu predstavljaju metodu gde se nastavni sadržaj ili aktivnosti u učenju isporučuju uz pomoć elektronskih tehnologija. Da bi to bilo moguće potrebno je ustanoviti elektronske sisteme za upravljanje učenjem. Nacionalni standardi kvaliteta u visokom obrazovanju prepoznaju učenje na daljinu i definisali su koji su to minimumi koji se moraju ispuniti da bi učenje na daljinu bilo adekvatno. Ipak, da bi učenje na daljinu dalo puni efekat, posebno je obezbediti kvalitetan dizajn digitalnog prostora za učenje, raditi kontinuirano formativno i sumativno ocenjivanje i obezbediti dovoljan fond sati za časove nastavnika i studenata "lice u lice". Nove elektronske komunikacije mogu pomoći u obogaćivanju nastave, ali ni u kom slučaju ne dovode u pitanje značaj nastavnika u procesu aktivnog prenošenja znanja.

Ključne reči: e-učenje, kvalitet, nastava, standardi.

### **Abstract**

The current epidemiological situation regarding COVID19 and the new generation of students who are almost born in a digital environment, raise the question of introducing e-learning as an indispensable didactic tool. E-learning or online learning or distance learning is a method where teaching content or learning activities are delivered using electronic technologies. In order for that to be possible, it is necessary to establish electronic learning management systems. National quality standards in higher education recognize distance learning and have defined the minimums that must be met in order for distance learning to be adequate. However, in order for distance learning to give its full effect, it is necessary to provide quality design of digital learning space, to do continuous formative and summative assessment and to provide a sufficient fund of hours for teacher and student classes "face to face". New electronic communications can help enrich teaching, but in no way question the importance of teachers in the process of active knowledge transfer.

Key words: e-learning, quality, teaching, standards.

### **Definicija učenja na daljinu**

Po definiciji Američke asocijacije ASTD iz 2001. godine (American Society for Trainers and Development) e-learning, odnosno u prevodu elektronsko učenje, ili skraćeno e-učenje, je metodologija kojom se "nastavni sadržaj ili aktivnosti u učenju isporučuju uz pomoć elektronskih tehnologija" (eng. instructional content or learning experiences delivered or enabled by electronic technology). Time se objedinjuju svi diversifikativni nazivi za elektronsko učenje: - Elektronsko učenje (E learning), - Web utemeljeno učenje (Web Based Learning), - Web utemeljena nastava (Web Based Instruction), - Vežbanje utemeljeno na Internetu (Internet Based Training), - Raspodeljeno učenje (Distribute Learning), - Napredno raspodeljeno učenje (Advanced Distributed Learning), -Udaljeno učenje (Distance Learning), -

On-line učenje (On-line Learning), - Mobilno učenje (Mobile Learning), - Upravljanje učenjem (Remote Learning), i dr.

### **Razvojne faze učenja na daljinu**

U knjizi “International Handbook of Distance Education” - Tony Bates, oslanjajući se na Taylor-ovo viđenje, ističe razvojne faze u daljinskom obrazovanju. Zato su, prema Taylor-u, etape razvoja daljinskog učenja podeljene na pet ključnih faza: 1) dopisno obrazovanje; 2) integrisano višestruko, jednosmerno obrazovanje primenom štampanih materijala i medija kao što su knjige i video – kasete; 3) dvosmerno, sinhrono tele-učenje primenom video - konferencijskih alata; 4) fleksibilno učenje zasnovano na asinhronom online učenju primenjeno u kombinaciji sa online interaktivnim multimedijama; 5) inteligentno orijentisani, fleksibilni sistemi, koji stvaraju i omogućavaju visoke nivoe automatizacije, ali i kontrole u domenu asinhrono orijentisanih modela uključujući i multimediju.

### **Sistemi za upravljanje učenjem (LMS)**

Razvoj tehnologije pred sam kraj 20. veka doveo je do pojave LMSa (Learning Management System), sistema za upravljanje učenjem. Ovi sistemi omogućavaju da nastavnik prati individualni rad i napredak svakog učenika i da podatke beleži u određenu bazu podataka. Iako je pojava ovih sistema naišla na odličan odziv u obrazovanju, vremenom je ustanovljeno da LMS treba dopuniti drugim alatima (do tada se koristio samo za distribuciju nastavnih materijala), kako bi učenik mogao da postane aktivni činilac nastavnog procesa, a ne da bude samo pasivni posmatrač i primalac znanja.

LMS je termin koji se odnosi na veb aplikacije koje rade na serveru, a pristupa im se preko veb čitača. Server je obično stacioniran u vašoj računarskoj učionici, a može biti i bilo gde u svetu. Može mu se pristupiti kroz lokalnu računarsku mrežu ili putem internet konekcije. LMS-ovi daju nastavnicima alate za kreiranje veb sajta kursa i daju mu mogućnost kontrole pristupa, tako da samo upisani polaznici mogu da ga vide. Pored kontrole pristupa, LMS-ovi poseduju različite alate koji mogu pomoći da kurs bude još uspešniji. Oni omogućavaju jednostavno ostavljanje dokumenata, vođenje diskusija na mreži, testiranje i anketiranje polaznika, prikupljanje i pregled zadataka, snimanje ocena. Većina obrazovnih platformi koje su sposobne za ostvarivanje elektronske nastave i učenja, pored pojmovnih razlika obezbeđuju vrlo slične mogućnosti korisnicima. Najbitniji i najosnovniji elementi su ugrađeni skoro u svim sistemima su:

Mogućnost za stvaranje, unos, sistematizaciju, modifikaciju raznih komponenti nastavnog materijala (tekst, multimedija, simulacija) i za njih vezane kalendare, kursne vesti. · Sredstva za određivanje strukture nastavnih komponenti · Testmodul, upitnik i razni moduli za procenjivanje i za proveravanje znanja, elektronski dnevnik · Registracija samostalnih i zajedničkih akcija korisnika, sredstvo za obezbeđenje samostalanog-, individualnog-, privatnog- i zajedničkog rada · Korisnički profili dostupni lozinkom, sredstva koja omogućuju podešavanje privatnih profila · Određene dostupnosti prema modulovima sistema za svaki profil (npr. Za komponente kursa ili za elektronski dnevnik) · Sredstva koja omogućuju zajedničko razvijanje, dopunjivanje, procenjivanje pojedinih komponenta nastavnog materijala · Mogućnost odrade samostalne stranice za predstavljanje u okviru sistema · Mogućnosti E-maila, foruma, chata, e-portfolia, audia i vedeokonferencija · Administrativni moduli za sistematizaciju podataka portala, kurseva i korisnika · Moduli za elektronsku trgovinu, sistem za elektronsko plaćanje (online plaćanje).

### **Kako povećati kvalitet online nastave?**

Pojavilo se nekoliko metoda za poboljšanje onlajn predavanja. Prvo se moraju rešiti očigledni problemi poput loše integracije, nedostatka veština ili tehničkih kvarova.

- Dizajn kursa za digitalne programe - Onlajn časovi moraju biti dizajnirani posebno za digitalne uređaje, a ne samo za prenos onlajn sadržaja u digitalni format. Lenji dizajn kurseva na kraju stvara distancirajuće iskustvo za studente. Nastavnici u nedavnom istraživanju australijskih univerziteta posebno su primetili da sadržaj predavanja koji je samo konvertovan u video format nije dovoljan da angažuje njihove studente.



Da bi se rešili ovog problema, nastavnici mogu da koriste alate poput Interaktivnog videa kako bi svoja predavanja na mreži učinili privlačnijim.

- Koristite interakcije licem u lice kada je to moguće - Jedan od najvećih problema sa onlajn časovima je loša stopa zadržavanja. Međutim, ako se onlajn časovi pažljivo kombinuju sa interakcijama licem u lice, veća je verovatnoća da će se stope zadržavanja poboljšati. Kontakt licem u lice ne mora nužno da uključuje nastavu, ali može da uključuje podršku nastavnika u obliku video poziva bez obzira koriste li Skipe ili Zoom. Studije pokazuju da studentima, posebno studentima milenijuma, treba osećaj da o njima brinu njihovi profesori i da im taj osećaj može dramatično poboljšati motivaciju.
- Podržani angažman je presudan - Generalno, redovna i konstruktivna komunikacija između učenika i nastavnika poboljšava iskustvo učenja na mreži. Često se naziva angažovanjem uz podršku. U stvari, nedavna studija utvrdila je da su „kvalitet i blagovremenost povratnih informacija predavača najcenjeniji oblik povezanosti učenja koji su identifikovali studenti“. Petlja povratnih informacija koja je automatski prisutna u interakciji licem u lice treba uzeti u obzir prilikom onlajn predavanja kurseva. Nastavnici mogu da koriste obrazovne alate kao što je pregled zadatka ili mogu da daju svoje povratne informacije u obliku odgovora na diskusiju, redovnog formativnog ocenjivanja i grupnih aktivnosti kao što su viki ili forumi.
- Postavite jasna očekivanja od učenja - Neki studenti se bore sa onlajn časovima jer su navikli na intimniji stil predavanja. Za nastavnike je važno da svojim učenicima postave jasna očekivanja. Mnogi studenti neće imati prethodno iskustvo u upravljanju vlastitim iskustvom učenja. Ovo prekidanje veze može biti još jače sa onlajn časovima. Očekivanja poput zahteva od učenika da predaju redovne formativne procene mogu biti od pomoći u usmeravanju učenikove energije.

### **Nacionalni standardi kvaliteta obrazovanja na daljinu i standardi tehnologije obrazovanja**

Studijski program zasnovan na metodama i tehnologijama obrazovanja na daljinu podržan je resursima koji obezbeđuju kvalitetno izvođenje studijskog programa. Visokoškolska ustanova može organizovati studijski program na daljinu za svaku oblast i svako obrazovno-naučno i obrazovno-umetničko polje, ako nastavni sadržaj, podržan raspoloživim resursima, može kvalitetno usvojiti kroz studije na daljinu i ako se obezbeđuje isti nivo znanja diplomiranih studenata, ista efikasnost studiranja i isti rang (kvalitet) diplome kao i u slučaju uobičajenog načina realizacije studijskog programa.

*Uputstvo za primenu standarda 15:*

*Program*

*15.1. Studijski program na daljinu može biti akreditovan samo ako visokoškolska ustanova ima akreditovan studijski program pod istim nazivom koji se realizuje na klasičan način u sedištu ustanove.*

*Proces nastave i komunikacija*

*15.2. Sadržaj predmeta studijskog programa je savremeno koncipiran i prilagođen učenju na daljinu sa naznačenim potrebnim vremenom za konsultacije (po utvrđenom rasporedu).*

*15.3. On line nastava na daljinu realizuje se u definisanim terminima po utvrđenom i objavljenom rasporedu.*

*Paket materijala za učenje na daljinu*

*15.4. Nastavni materijal u pogledu kvaliteta, sadržaja i obima u potpunosti odgovara ciljevima obrazovanja, nastavnom planu i programima predmeta i prilagođen je za samostalno uspešno ovladavanje potrebnim znanjem.*

*15.5. Pravilnikom o izvođenju studija na daljinu, obezbeđeno je kontinuirano usavršavanje materijala za učenje.*

*15.6. Uputstva za učenje koja obezbeđuje visokoškolska ustanova sadrže konkretne predloge i sugestije u vezi strategije učenja studenata i samostalne provere znanja.*

*15.7. Visokoškolska ustanova je u obavezi da osigura upotrebu adekvatnih medija i tehnologija koji odgovaraju prirodi programa, kao i odgovarajuću obuku i stručnupodršku za nastavnike i saradnike.*

*Ekvivalentnost kvaliteta diplome klasičnog sistema učenja i učenja na daljinu*

*15.8. Studijski program na daljinu može da se organizuje za svaku oblast i svako obrazovno-naučno i obrazovno-umetničko polje, ako se nastavni sadržaj može kvalitetno usvojiti kroz studije na daljinu i ako obezbeđuje iste ishode učenja, efikasnost studiranja i nivo kvalifikacije kao i u slučaju klasičnog načina realizacije studijskog programa.*

*15.9. Metod rada, nastavni kadar i informaciono-komunikaciona platforma za studije na daljinu obezbeđuju isti kvalitet diplome kao i u slučaju klasičnog učenja.*

15.10. Kao i kod klasičnih studija, studijski program je formalno i strukturno usklađen sa najmanje tri akreditovana programa inostranih visokoškolskih ustanova, od kojih su najmanje dva iz ustanova evropskog obrazovnog prostora. Ocenjivanje i napredovanje studenata

15.14. Podsystem za proveru znanja studenata je integrisan u sistem za upravljanje procesom učenja na daljinu i podržava sigurnosnu funkciju kod identifikacije studenata, nastavnika i saradnika, kao i različite oblike učenja i provere znanja (konsultacije, samoprovera, testiranje, izveštaji, ispit), čime se stiču odgovarajuće kompetencije.

15.15. Obezbeđena je sigurnost utvrđivanja identiteta studenata kod testiranja.

15.16. Kontrola i ocenjivanje znanja studenata sprovode se kroz različite forme predispitnih provera i kroz završni ispit, pod istim uslovima kao i kod klasičnih studija.

15.17. Ispit se polaže u sedištu visokoškolske ustanove, odnosno u objektima navedenim u dozvoli za rad visokoškolske ustanove.

Resursi (oprema, biblioteka i prostor)

15.23. Visokoškolska ustanova obezbeđuje opremu i komunikaciono-informatičke tehnologije za uspostavljanje i održavanje dvosmerne komunikacije na liniji nastavnik– student radi realizacije obrazovnih aktivnosti na daljinu (delovi nastave, konsultacije, samoprovere, provere znanja u sklopu predispitnih obaveza, projekti, seminarski radovi i sl.). U okviru sistema za upravljanje procesom učenja na daljinu visokoškolska ustanova mora da obezbedi:

a. jednu sopstvenu ili zakupljenu integrisanu računarsku platformu koja ima adekvatne tehničke karakteristike za učenje na daljinu (DLS - Distance Learning System), sa specijalizovanim softverom za smeštaj i distribuciju multimedijalnih nastavnih sadržaja namenjenih za samostalno usvajanje (tekst, zvučne i video informacije) i za kompletno upravljanje procesom učenja;

b. različite oblike nastave: javno emitovanje vremenski planiranog nastavnog događaja (emitovanje predavanja ili diskusija nastavnika/stručnjaka snimljene uz pomoć video kamera uživo ili ranije napravljenog i pripremljenog video snimka), isporuku predavanja i multimedijalnih nastavnih materijala sa servera i konsultacije za vođeno i neformalno putem diskusionih foruma;

v. jedinstven korisnički interfejs koji podržava više kategorija korisnika, uključujući studente, nastavnike i administrativno osoblje;

g. obavezu evidentiranja vremena koje student provede na proučavanju nastavnog materijala i proveru i ocenjivanje studenata pomoću testova, a uz podršku i pod kontrolom specijalizovanog softverskog paketa;

d. visoku pouzdanost sistema kroz odgovarajući sistem kontrole pristupa i zaštite sadržaja;

đ. definisanje ovlašćenja za postavljanje materijala od strane nastavnika i saradnika, administrativnog osoblja i studenata;

e. komunikaciju nastavnika i saradnika sa studentima koja uključuje upotrebu elektronske pošte, diskusionih foruma i diskusija u realnom vremenu;

ž. proveru i ocenjivanje studenata na daljinu (samoprovere, predispitne provere, podnošenje izveštaja, ispit);

z. evidentiranje pristupa sistemu od strane svih korisnika.

15.24. Infrastruktura sistema za učenje na daljinu mora biti tako projektovana i održavana da obezbedi poverljivost i integritet podataka, odnosno kontinuitet nastavnog procesa.

15.25. Visokoškolska ustanova obezbeđuje pristup sopstvenoj ili drugim odgovarajućim bibliotekama, a posebno organizacijama koje su specijalizovane za isporuku u elektronskom obliku udžbenika i drugih nastavnih i naučnih publikacija.

15.26. Visokoškolska ustanova raspolaže prostorom koji po veličini i uslovima obezbeđuje normalno obavljanje završnog ispita, rad administrativnog osoblja i smeštaj i rad na održavanju integrisane računarske platforme za podršku učenju na daljinu.

15.27. Visokoškolska ustanova koja studijski program izvodi kroz učenje na daljinu treba da ima organizacionu jedinicu (odeljenje/centar) za učenje na daljinu.

Kontrola kvaliteta studija na daljinu i održavanje sistema:

15.28. Visokoškolska ustanova donosi pravilnik o izvođenju studija na daljinu, u kojem su definisani svi elementi kojima se garantuje odgovarajući nivo kvaliteta kroz:

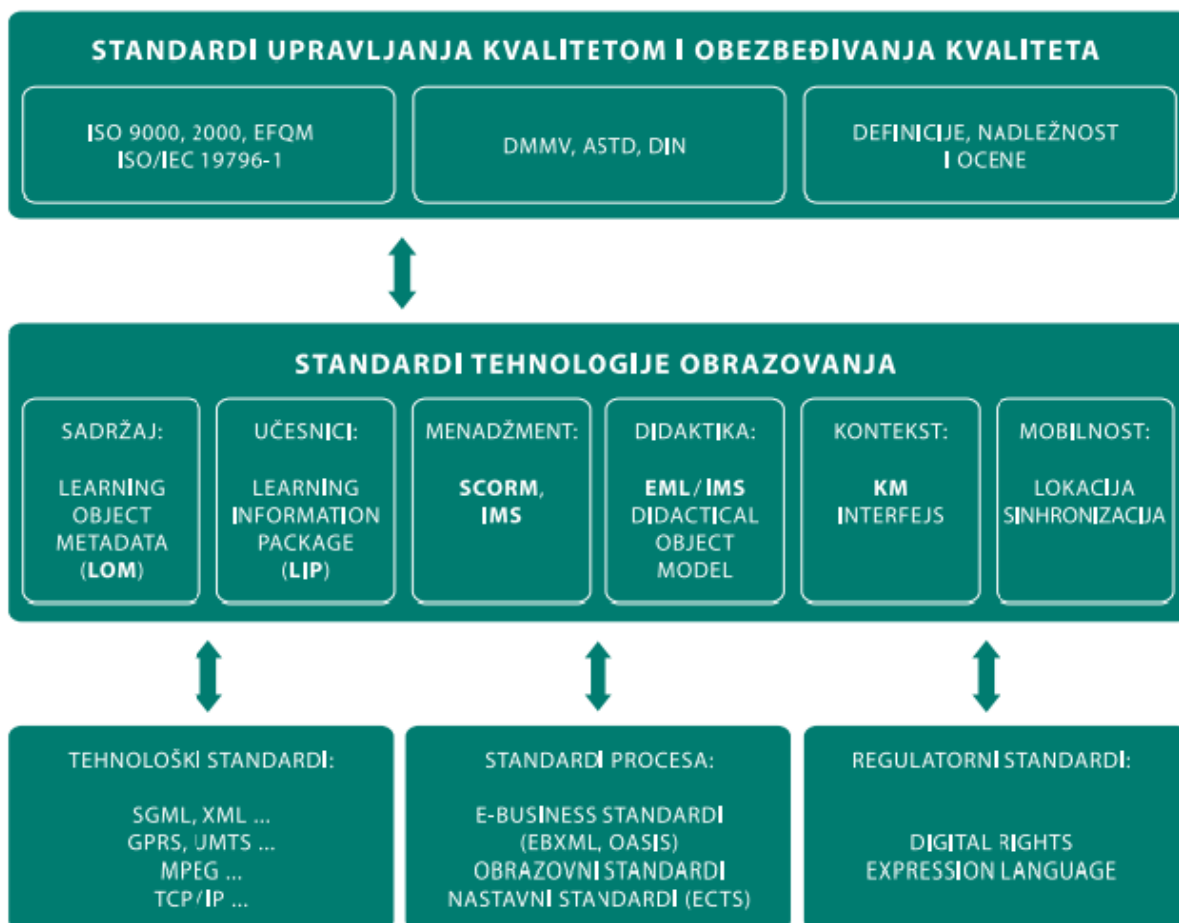
a. poštovanje odgovarajućih radnih standarda i to prevashodno u oblasti obrazovanje (organizacija rada i metodički aspekt studija), kao i u oblasti informacione tehnologije (e- učenje).

b. kontrolu kvaliteta od strane nadležnih,

v. kontinuirano unapređenje kvaliteta studija, kao i

g. sistematizovano radno mesto u ustanovi za održavanje infrastrukture sistema studija na daljinu.

Za potrebe razvoja fleksibilnosti i efikasnosti e-obrazovanja razvijen je veliki broj različitih standarda. Na sledećoj slici prikazana je njihova klasifikacija.



#### Literatura

1. Cincović M.R., Belić B., Novakov N. Standardi kvaliteta online nastave i učenja na daljinu-nastava na Departmanu za veterinarsku medicinu tokom pandemije COVID19. 31.Savetovanje veterinara Srbije, online-webinar, 10-13.09.2020.
2. Cincović M.R. (ur.): Kvalitet u veterinarskom visokom obrazovanju. Novi Sad, 2020.
3. Devlin, M. eLearning Vision. Federation University. 2013.
4. Glušac D.: Elektronsko učenje, Zrenjanin, 2012.
5. Jacob S., Radhai S. Trends in ICT e-learning: Challenges and expectations. International Journal of Innovative Research & Development 2016, 5(2), 196–201.
6. LINKgorup: E-learning, E-učenje. Beograd, 2012.
7. Miller AC, Mills B. 'If They Don't Care, I Don't Care': Millennial and Generation Z Students and the Impact of Faculty Caring', Journal of the Scholarship of Teaching and Learning 2019, 19(4): 78-89.
8. Nacionalno akreditaciono telo za proveru kvaliteta u visokom obrazovanju Srbije: Standardi i uputstva za akreditaciju studijskih programa I i II stepena, 2019.
9. Ragusa AT, Crampton A. Sense of connection, identity and academic success in distance education: Sociologically exploring online learning environments. Rural Society 2018, 27(2): 125-142, pp.15.
10. Stone C. 'Online learning in Australian higher education: Opportunities, challenges and transformations', Student Success 2019, 10(2): 1-11.

## **ULOGA VETERINARA U ODRŽIVOJ STOČARSKOJ PROIZVODNJI U MLEČNOM GOVEDARSTVU DANAS**

**Bojan Blond**

dr. vet. med. spec. veterinarske dijetetike,  
rukovodilac službe za ddd i centra za sakupljanje Aldahra Srbija, Beograd, Srbija  
e-mail kontakt osobe : bojan.blond@gmail.com

Niski proizvodni rezultati uzrokovani različitim činiocima, uz teške ekonomske uslove poslovanja poljoprivrednih gazdinstava, neminovno dovode do smanjenja stočnog fonda, čime se direktno ugrožava egzistencija, kako vlasnika životinja, tako i subjekata uključenih u stočarsku proizvodnju.

Mlečno govedarstvo predstavlja najkompleksniji vid stočarske proizvodnje, koja zahteva stalnu kontrolu inputa u jedinici proizvoda kako bi sama proizvodnja bila rentabilnija. Troškova na jednoj farmi je mnogo i samo sistemskom kontrolom moguće je i sa malim ulaganjima postići odlične rezultate, svesnim povećanjem preventivnih troškova u samom procesu proizvodnje moguće je smanjiti ostale troškove višestruko na kraju proizvodnog ciklusa, što bi direktno dovelo do smanjenja cene koštanja proizvedenog litra mleka.



Slika 1: Odnos kliničke i supkliničke forme bolesti na jednoj farmi

Posmatrajući gornju sliku, vrh ledenog brega predstavlja klinička forma bolesti na farmi (zapaljenja mlečne žlezde, zaostajanja posteljice, ketoze, dislokacije sirišta, ponovljeni estrusi, sitni jajnici, cistični jajnici...), ono što predstavlja najveći problem je deo ledenog brega koji nije vidljiv (supkliničke forme bolesti) i koji pravi ogromne štete proizvođačima u mlečnom govedarstvu. Cilj veterinara koji radi na farmi je da se uhvati u koštac sa uzrocima nastanka bolesti, uporedo sanirajući kliničku formu bolesti, jer i zapaljenja mlečne žlezde, zaostajanje posteljice, ketoze, dislokacije sirišta, ponovljeni estrusi, sitni jajnici, cistični jajnici... predstavljaju samo posledicu, a nikako uzrok.

Na vrhu piramide mlečnog govedarstva nalazi se proizvedeno mleko, tj. profit jedne farme, u njegovom stvaranju učestvuje mnoštvo delova koji su direktno vezani za veterinarsku delatnost, a to su: 1. zdravstvena zaštita; 2. podmladak; 3. preventiva zapata; 4. remont zapata; 5. dezinsekcija, dezinfekcija i deratizacija (DDD); 6. metabolički status zapata; 7. bakteriološki status zapata; 8. izbalansirana ishrana; 9. reprodukcija; 10. obrada papaka; 11. muzna oprema.

Faze laktacije u proizvodnji mleka jedne životinje su sledeće i svaka od ovih faza ima svoju specifičnost:

**1 faza: period zasušenja 60 - 25 dana do teljenja** – ovo je period zasušenja koji obuhvata fazu aktivne i pasivne involucije mlečne žlezde, faze koje su od neprocenjivog značaja za narednu laktaciju i dostizanje maksimalne proizvodnje po grlu. Jer „naredna laktacija ne počinje prvim danom nakon partusa već prvim danom zasušenja“; iz tog razloga ne sme se praviti kompromis sa vlasnicima životinja nego treba insistirati na zasušenju koje traje minimalno 60 dana.

**2 faza: period zasušenja 25 dana do teljenja** – ovo je period zasušenja koji obuhvata fazu kolostrogeneze, faza koja je bitna zbog stvaranja kolostruma i imuniteta rođenog teleta.

**3 faza: rana laktacija 8 - 70 dana od teljenja** – ovo je period laktacije u kome se suočavamo sa negativnim bilansom energije mlečnih grla.

**4 faza: sredina laktacije 70 - 140 dana od teljenja** – ovo je jedini period laktacije u kome, što je veća konzumacija suve materije hrane po grlu, to je i veća mlečnost tih životinja, i samo u ovoj fazi kravama treba dati da jedu po volji dnevni obrok bez bojazni da će doći do povećanja telesne kondicije.

**5 faza: kasna laktacija preko 140 dana do ulaska u zasušenje** – ovo je period laktacije u kome treba biti oprezan jer povećanje konzumacije suve materije dovodi neminovno do povećanja telesne mase životinja i do metaboličkih problema u narednoj laktaciji. Fiziološki, mlečnost bi trebalo da pada 8 - 10 % mesečno jer svako srljanje u održavanje visokih proizvodnih rezultata u ovom periodu dovodi do neekonomične proizvodnje na duge staze.

### **Ishrana životinja:**

Najvažniji i najveći trošak svake stočarske proizvodnje predstavlja hrana za životinje. U zavisnosti od komponenti koje učestvuju u formiranju obroka, moguće je postići visoke proizvodne rezultate koji moraju biti usklađeni sa zdravstvenim statusom životinja. Mlečno govedarstvo je kontinuiran proces i životinje treba sačuvati za naredne laktacije. Nekontrolisano visoka proizvodnja povećava % izlučenje životinja, povećava % manifestnih bolesti metabolizma u narednim laktacijama, probleme sa sterilitetom... Pravilnom koncepcijom obroka možemo sprečiti embrionalna uginuća zbog toksičnog dejstva uree na matericu životinje koja nastaje kao direktna posledica povećane količine proteina u hrani što neminovno dovodi do manje ekonomičnosti proizvedenog litra mleka na farmi zbog nepravilno iskorišćenog proteinskog dela obroka. Energetski nestabilne životinje u periodu osemenjavanja proizvode nekvalitetne jajne ćelije koje, i pored semena bikova vrhunskog kvaliteta, stvaraju embrione lošeg kvaliteta i dovode do pobačaja. Dnevna proizvodnja mleka grlu do 25 l po kravi kod dobro formiranog obroka može se zadovoljiti mikrobiološkom sintezom proteina u buragu.

Osnovna podela komponenti obroka i njihove specifičnosti:

**1. Kabasti deo obroka - silaža, senaža, slama...** bitna nam je kiselost i kiselinski sastav, dužina isečka, miris, boja... On direktno učestvuje u procesu preživanja životinja, jer bez puferskog efekta pljuvačke (pH = 8,2 - 8,4) nije moguće imati u potpunosti iskorišćen obrok. Vredosti mlečne masti u proizvedenom mleku zavise od kabastog dela obroka i sve proizvodnje preko 30 l mleka po kravi dnevno direktno su uslovljene kvalitetnim kabastim obrokom.

**2. Koncetrovani deo obroka...** bitna nam je usitnjenost, sastav komponenti, miris... nosilac je najvećeg dela proteina u dnevnom obroku, a takođe direktno učestvuje u stvaranju glukoze bez koje nema ni proizvodnje mleka u mlečnoj žlezdi.

**3. Dodaci ishrani - kvasci, omega 3 i omega 6 masne kiseline, pufferi, premiksi...** služe za bolju iskoristivost dobro koncipiranog obroka, a nikako za korekciju posledica nepravilne ishrane.

Bitno je naglasiti da u 1 l proizvedenog mleka procentualno učešće hrane ne sme preći 50 %.

Cilj nam je :

- dobro koncipiran obrok sa potpuno iskorišćenim proteinskim delom obroka;
- energetski stabilne životinje sa optimalnom telesnom kondicijom za fazu laktacije kojoj pripadaju;
- stabilan mineralni status životinja na farmi.

### **Metabolički status životinja:**

I pored obroka koji je sastavljen po tabličnim principima dobre nutritivne prakse, najbitnije za nas je šta su nahranjene životinje usvojile u svoj organizam. Poznavanje metaboličkog statusa zapata je vrlo bitno kako bismo mogli da preveniramo pojavu kliničkih metaboličkih bolesti na farmama, malim korekcijama korišćenog obroka do trenutka vađenja krvi.

Postoje četiri obroka:

**1. prvi obrok** – je hranivo koje se nalazi na obradivoj površini i trenutak odluke kada će hranivo biti korišćeno u ishrani (povećanje mase uslovljava pad proteinskog dela hraniva i obratno).

**2. drugi obrok** – je samo skladištenje hraniva i manipulacija na obradivoj površini (zastupljenost zrna, lista i njegova razbijenost).

**3. treći obrok** – je obrok dostavljen pred životinje, njihova mogućnost konzumiranja, selektivnost u odabiru komponenti obroka.

**4. četvrti obrok** – i najvažniji koji je svaren i u potpunosti iskorišćen u organizmu životinja; iz tog razloga metabolički status je nezamenjiva dijagnostička metoda za procenu kvalitativnog obroka na farmi.

Metabolički profil je najbolje raditi u jesen (kada se otvaraju nove silo jame) i u proleće kada stiže nova hrana, tj. dva puta godišnje.

Generalna preporuka je da se metabolički profil radi kao dijagnostičko profilaktičko sredstvo (redovan metabolički profil - jesen / proleće) ili kada nastanu velike promene u ishrani, problemi u reprodukciji, povećan % izlučenja životinja, veći pad mlečnosti i poremećaj hemijskog sastava mleka kada se koristi kao dijagnostičko sredstvo (vanredni metabolički profil).

Cilj nam je metodama pravovremene dijagnostike prepoznati metabolički supklinički problem kako bismo sprečili nastanak:

1. **kliničke forme bolesti metabolizma** (troškove lečenja, neizvesnost u ishod lečenja...);
2. **smanjenja proizvodnih rezultata** (rentabilnost proizvodnje...);
3. **problema u reprodukciji** (izostanak prvog fertilnog ciklusa, embrionalna uginuća ploda...);
4. **infektivne bolesti** (imunosupresija...);
5. **troškova obroka** (suficit proteina u obroku...).

Parametri metaboličkog značaja su:

- **urea** iznad **6,8 mmol/l** - embriotoksično dejstvo na plod;
- **BHBA** iznad **1,0 mmol/l** kod oteľjenih krava - energetska nestabilnost životinje;
- **kalcijum** ispod **2,0 mmol/l** - RS, dislokacije sirišta, pareze, problemi u reprodukciji;
- **ukupan bilirubin** iznad **8,5 mmol/l** - sindrom masne jetre;
- **globulini** iznad **49,0 g/l** - zapaljenska reakcija organizma.

Cilj na je:

- maksimum 10 % sindroma masne jetre u odnosu na broj oteľjenih u poslednjih 60 dana;
- maksimum 5 % zaostajanja posteljice u odnosu na broj oteľjenih u poslednjih 60 dana;
- maksimum 5 % kliničkog oblika ketoze u odnosu na broj oteľjenih u poslednjih 60 dana;
- maksimum 5 % dislokacije sirišta u odnosu na broj oteľjenih u poslednjih 60 dana.

### Reprodukcija:

Samo sveže krave mogu biti nosioci uspešne proizvodnje mleka, što zahteva poznavanje i rad na smanjenju servis perioda na farmi i poboljšanju reproduktivnih parametara.

Reproduktivni parametri koje treba pratiti na jednoj farmi su:

1. **Servis period** - vreme od telenja do sledeće koncepcije, poželjno je da bude 90 - 120 -150 dana,
2. **Međutelidbeni period** - vreme proteklo između 2 teljenja, poželjno je da bude 365 - 395 - 425 dana,
3. **Minimum 50 % steonost krava na stanju** u svakom trenutku (steone + zasušene krave),
4. **Maksimum 12 % zasušenih krava na stanju** u svakom trenutku,
5. **Zasušenje 60 dana.**

Praćenje ovih reproduktivnih parametara je bitno zbog pravilne „laktacione krive zapata”, koja omogućava maksimalnu iskoristivost zapata i maksimalne proizvodne rezultate.

Cilj nam je:

### parametri za junice :

- indeks osemenjavanja za junice (1,5 - 1,7)
- veštačko osemenjavanje starost junica 13 - 15 meseci
- težina junica preko 375 kg
- visina grebena 135 cm
- teljenje junica sa 22 - 24 meseca

- oteljenost junica 96 % na broj utvrđene steonosti
- da od broja junica koje su ušle u osemenjavanje 96 % ostane steono

**parametri za krave :**

- indeks osemenjavanja za krave (2,0 - 2,3)
- oteljenost krava 92 % na broj utvrđene steonosti
- pregled krava na steonost 30 - 40 dana (konačna potvrda steonosti sa 55 - 60 dana)

**Funkcionalna nega papaka:**

Funkcionalna nega papaka predstavlja važnu meru brige o stadu krava. Primenom metode po Ravenu postiže se dobro zdravstveno stanje papaka i ekstremiteta životinja. Samo krave kod kojih su redovno korigovani i lečeni papci mogu dati svoj maksimum u proizvodnji mleka. Ekonomske štete nastale usled hromosti kod krava su:

1. prerano isključivanje iz proizvodnje (uginuće i ekonomsko klanje)
2. pad mlečnosti 5 - 35%
3. poremećaji reprodukcije (tihi estrusi, smanjena koncepcija, produžen servis period)
4. gubitak telesne mase usled smanjenog konzumiranja hrane
5. povećani troškovi lečenja
6. povećan rizik od nastanka zapaljenja mlečne žlezde

Ciljevi su nam:

- minimum dva puta obrada papaka godišnje kako bi životinje imale pravilan stav ekstremiteta i zdrave papke
- prioritarna obrada papaka i terapija svih hromih krava
- maksimum 10 % hromih krava na farmi
- maksimum 10 % čireva papaka na farmi
- maksimum 2 % izlučenih krava po osnovu oboljenja papaka

**Bakteriološki status zapata:**

Poznavanje bakteriološke situacije na farmi je od suštinskog značaja prilikom odabira antibiotika u lečenju kliničke forme zapaljenja mlečne žlezde, sprečavanja širenja specifičnih uzročnika mastitisa na farmi, kontrole uspešnosti dezinfekcije... Specifični uzročnici zapaljenja mlečne žlezde u inficiranom vimenu oštećuju žlezdani epitel mlečne žlezde i direktno utiču na količinu proizvedenog mleka po grlu (smanjenje čak do 50 %). Vrlo često ne izazivaju teške oblike kliničkog mastitisa kod inficiranih životinja i kao takvi prođu nedijagnostikovano pa se lako šire po farmi preko ljudi koji muzu životinje, muzne opreme, prostirke. Specifični uzročnici svojim prisustvom u vimenu podižu broj somatskih u zbirnom uzorku mleka, a kako se prenose vrlo lako sa životinje na životinju ako se ne poštuje pravilna procedura muže krava, narušavaju rentabilnu proizvodnju mleka. Bakteriološko ispitivanje pre i posle izvršene dezinfekcije podova, muzne opreme, pomaže smanjenju troškova lečenja, omogućava planske vakcinacije životinja kako bi se preventirali gubici kako podmlatka tako i odraslih životinja (*Stap. Aureus*, *Strep. Agalactiae*, *E. Coli* i *Clostridia Spp.*). Mastitis nije *uzrok* nego je uvek *posledica* različitih faktora koji dovode do njegovog nastanka i tako se prema tome treba i odnositi prilikom terapije istih.

Ciljevi su nam:

- maksimum 5% kliničkih mastita u prvih mesec dana laktacije (ili od oteljenih krava)
- maksimum 1,5 % kliničkih mastitisa mesečno (ili od oteljenih krava)
- maksimum 15 % kliničkih mastitisa godišnje (ili od oteljenih krava)

**Dezinfekcija, deratizacija i dezinsekcija (DDD):**

Dezinfekcija, deratizacija i dezinsekcija (DDD) predstavlja polaznu osnovu svake uspešne stočarske proizvodnje. Za dobre rezultate DDD potrebna je pravilna upotreba sredstava, kao i priprema površine, objekta u kome se radi, jer ni najbolje sredstvo neće imati efekta ako se ne uklone mehaničke

nečistoće kod dezinfekcije, ukloni balega iz okoline štala kod dezinfekcije ili zaštite otrovi od vlage kod deratizacije.

Kontrola u realnim terenskim uslovima pruža odgovore o kvalitetu DDD (brisevi površina, prebrojavanje populacije glodara i insekata...) jer to doprinosi boljem zdravlju podmlatka i odraslih životinja

Ciljevi su nam :

- maksimum do 100 bakterija na centimetru kvadratnom nakon izvršene dezinfekcije
- smanjenje populacije glodara na najmanju moguću meru
- smanjenje populacije insekata na najmanju moguću meru

### **Somatske ćelije:**

Određivanje broja somatskih ćelija u jedinici vremena u zbirnom uzorku mleka predstavlja veoma važan parametar praćenja bakteriološke situacije na farmi kao i zoohigijenskih mera koji se sprovode. Kako somatske ćelije predstavljaju 93% leukociti, a 7% epitelne ćelije, ćelije keratinskog sloja, izumrle sekretorne ćelije iz mlečnih alveola, to može jasno ukazati na postojanje zapaljenja mlečne žlezde. Iz tog razloga vrlo je bitno pratiti da li je taj skok somatskih ćelija iz zbirnog uzorka mleka brz ili postepen, jer brzo povećanje ukazuje na postojanje kliničke forme mastitisa sa nespecifičnim uzročnicima, dok postepeno povećanje ukazuje na supkliničku formu mastitisa sa specifičnim uzročnicima (stafilokok, streptokok...). Povećanje broja somatskih ćelija u zbirnom uzorku mleka može izazvati i toplotni stres, gruba prostirka, mehanička iritacija i loša laktaciona kriva zapata gde imamo na muži veći broj krava u kasnoj fazi laktacije sa dugačkim servis periodom. Iz tog razloga samo povećanje somatskih ćelija zahteva analizu uzroka nastanka, a nikako antibiotsku terapiju krava kod kojih su povećane somatske ćelije dok se ne dokaže infekcija vimena. Uzimanje zbirnog uzorka za somatske ćelije je kutlačom iz laktofriza nakon upaljane mešalice u trajanju od 2 \_\_\_\_\_, a pojedinačnog uzorka putem vajkatora ili mužom krave u kantu i nakon toga uzimanje kutlačom.

Somatske ćelije se u mleku ponašaju kao sediment pa ih je pre uzorka vrlo bitno homogenizovati kako ne bismo dobili lažno negativan rezultat. Povećanje broja somatskih ćelija negativno utiče na količinu proizvedenog mleka po životinji; istraživanja pokazuju da svako udvostručenje broja somatskih ćelija smanjuje za 2% količinu proizvedenog mleka.

Ciljevi su nam:

- maksimalno 200.000 somatskih ćelija u 1 ml mleka iz zbirnog uzorka (laktofriza)

### **Kiselost mleka:**

Povećanje kiselosti je direktno uzrokovano prisustvom bakterija, temperaturom skladištenja i brzinom hlađenja mleka, načinom ishrane krava. Vrlo često uzrok pojave kiselosti mleka leži na farmama predstavlja muzna oprema koja nije servisirana redovno ili promene u količini namuženog mleka nakon nabavljanja novih grla na farmi pa sam kapacitet laktofriza nije u stanju da dovoljno brzo ohladi pomuženo mleko i time se stvaraju uslovi za razmnožavanje mikroorganizama.

Ciljevi su nam:

- kiselost mleka u opsegu 6,4 - 6,8

### **Podmladak:**

Zdrav podmladak je preduslov uspešne govedarske proizvodnje i dobrog remonta stada. Vrlo je bitno obratiti pažnju na napajanje novorođene teladi kolostrumom. Resorpcija imonoglobulina vrši se isključivo preko sluzokože creva teleta. S obzirom na to da procenat resorpcije imunoglobulina opada u jedinici vremena, vrlo je važan vremenski period koji protekne od dolaska teleta na svet do prvog napajanja. Novorođena telad moraju biti napojena kolostrumom najkasnije 2 sata nakon teljenja; u slučaju da tele odbija da pije putem cucle ili prsta, mora se koristiti intragastrična sonda kojom se naliva direktno



u želudac 2 - 3 kolostruma. Ovo je bitno zbog procenta resorpcije imunoglobulina preko creva teleta jer ona tada iznosi 96%, dok posle 6 sati stepen resorpcije je sveden na 64% i kako vreme odmiče resorptivnost sve više opada. Za svaku farmu je bitno postojanje banke kolostruma, tj. zamrznuti kolostrum u plastičnim flašama. Za banku najbolje je koristiti kolostrum krava iz većeg broja laktacija znajući da prvotelke imaju 25 g/l imunoglobulina G, drugotelke 37 g/l imunoglobulina G... Nakon odmrzavanja kolostruma, bitno je da se ne izlaže visokim temperaturama zbog denaturacije proteina već lagano zagrevanje pre aplikacije teladima. Imunološki status teladi i prognozu prilikom lečenja teladi u prvim danima života možemo dobiti biohemijskom analizom krvi i određivanjem ukupnih proteina i albumina. Dobijena razlika predstavlja globulinsku frakciju u organizmu i najbolje je raditi kod teladi do 48 sati nakon rođenja. Istraživanja su pokazala da telad sa vrednostima globulina ispod 20 g/l nakon 48 sati imaju prognostički vrlo loš status i takvim teladima najbolje je aplikovati komercijalne imunoglobulinske komplekse.

Ciljevi su nam:

- maksimalno 4 % izlučenja teladi u prvih mesec dana od teljenja
- maksimalno 4 % izlučenja teladi od 1 do 4 meseca u odnosu na ulaz
- maksimalno 0,5 % izlučenja junadi preko 4 meseca u odnosu na ulaz

### **Zasušenje krava:**

Početak nove laktacije svake krave počinje prvim danom zasušenja, a ne prvim danom kada krava počne da se muže nakon partusa. Iz tog razloga vrlo je bitno insistirati da period zasušenja traje 60 dana.

Period zasušenja ima tri faze:

1. faza aktivne involucije - 15 dana
2. faza pasivne involucije (pravi odmor za mlečnu žlezdu i priprema za novu laktaciju bez čega nema ni dostizanja maksimalne proizvodnje u narednoj laktaciji) - 30 dana
3. faza kolostogeneze - 15 dana

Prilikom zasušivanja životinja izbegavati preskakanje muže, uskraćivanje kvalitativnog obroka, uskraćivanje vode. Najbolje je, ako postoje uslovi, odvojiti krave u laktaciji od krava koje se zasušuju (zbog oksitocinskog refleksa), za krave koje imaju do 20 l mleka dnevno dovoljno je pomesti krave 60 dana do očekivanog teljenja; ispoštovati pravilnu proceduru muže krava (dezinfekcija pre i posle muže), ubaciti injektore za zasušenje i pratiti životinju narednih 2 do 3 dana da li će doći do reakcije vimena. Za krave koje u trenutku zasušenja imaju više od 20 litara mleka (što je zanemarljiv broj ako je ishrana usklađena sa fazom laktacije) potrebno je par dana pre 60 dana od očekivanog teljenja tim životinjama umanjiti energetske i proteinske deo dnevnog obroka za 30 %, bez uskraćivanja vode i preskakanja muža.

Ciljevi su nam:

- trajanje zasušenja 60 dana

### **Muzna oprema:**

Neispravna muzna oprema je jedan od najbitnijih uzročnika nastanka zapaljenja mlečne žlezde kod krava u laktaciji.

Na stanje papila vimena utiču:

- previsok vakuum (vakuum 4,2 - 4,8 kpa)
- prenizak vakuum (vakuum 4,2 - 4,8 kpa)
- broj pulzacija (40 - 60 / u minuti)
- dotrajale, uvrnute, ispucale gume na čašama muznih jedinica (remont minimum na 6 meseci)
- održavanje muzne opreme (ispiranje toplom vodom, dezinficijensima posle svake muže)

Vrlo često prilikom muže krava dotežu se muzilice ručno kako bi što manje mleka ostalo u vimenu krava. To nije dobro jer dodatnim pritiskom samo pravimo dodatne lezije na papilama i

omogućavamo naseljavanje bakterija iz okruženja životinja (automatske muzne jedinice se automatski otpuštaju sa papila čim protok mleka padne ispod 250 ml / min).

Održiva stočarska proizvodnja je zajedničko delovanje različitih činilaca koji su uključeni u sam proces proizvodnje, a to su:

1. minimum muzni prosek 22 l (štalski prosek 19,5 l)
2. maksimum 12 % zasušenih krava na stanju u svakom momentu obezbeđuje optimalnu laktacionu krivu
3. % učešća obroka u ceni proizvedenog litra mleka do 50 %
4. farma slobodna od specifičnih uzročnika mastitisa
5. napajanje teladi najkasnije 2 sata posle teljenja (banke kolostruma)
6. ispravna muzna oprema
7. pravilna procedura muže krava
8. metabolički stabilne životinje
9. izbalansiran obrok

#### Literatura :

1. Bačić. G. (2009): *Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda*, Veterinarski fakultet, Zagreb.
2. Grubić, Adamović (2003): *Ishrana visokoproizvodnih krava*. Institut PKB Agroekonomik, Beograd.
3. Jovanović, Dujčić, Glamočić (2001): *Ishrana domaćih životinja*. Stylos, Novi Sad. (strane 533-600)
4. Brandt, A., J.P.T.M. Noordhuizen, Y.H. Schukken (2001): *Herd Health and Production Management in Dairy Practice*. Wageningen Pers. Netherland
5. Sharma, N., A.K.Srivastava, G. Bačić, D. Kee Jeong i R.K. Sharma (2012): *Bovine mastitis*, Satish Serial Publishing House, Delhi, India, 2012.
6. Merck Veterinary manual
7. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, Parkinson JT, 1996, *Veterinary reproduction and Obstetrics, Seventh Edition*, WB, Saunders company, London
8. Doepel L, Lapiere H, Kennelly JJ, 2002, *Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum and energy intake*, *J Dairy Sci*, 85, 2315-23.
9. Grummer RR, 2008, *Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle*, *Vet J*, 176, 10-20.
10. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A, 2004, *Dry matter intake and energy balance in the transition period*, *Vet Clin North An Food Anim Pract*, 20, 447-70.
11. Jorristma R, Wensing T, Kruip TA, Vos PL, Noordhuizen JP, 2003, *Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows*, *Vet Res*, 34, 11-26
12. Van Knegsel AT, van der Brand H, Dijkstra J, Kemp B, 2007, *Effect of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation*, *Theriogenology*, 68, 274-289.
13. Vuković D, Maletić M, Pavlović M, Pavlović V, 2011, *Primena i terapeutski efekti hormona u reprodukciji krava*, II Naučni simpozijum „Reprodukcija domaćih životinja, Dičibare, 39-50
14. Vuković D, Perković S, 2012 *Veštačko osemnjavanje, plodnost i neplodnost goveda*, Naučna KMD
15. Jackson, P.G.G. (1996) In: *Handbook of Veterinary Obstetrics*. London: W.B. Saunders
16. Arthur, G.H.; Noakes, D.E.; Pearson H.: *Veterinary reproduction and obstetrics*; Elsevier Limited 2001.
17. Pejanović, R., Andrić, N. (2008); *Veličina farme i produktivnost u poljoprivredi EU, Savremena poljoprivreda*, vol.57,1-2, Str. 14-21, Novi Sad
18. Thomas Divers, Simon Peek, 2007, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*;
19. Dr Marko R, Cincović, 2016, *Metabolički stres krava*
20. Prof. dr Velibor R. Stojić, 2010, *Veterinarska fiziologija*

## KLINIČKO-PATOLOŠKI NALAZ KOD BABEZIOZE PASA

Nikolina Novakov, Jankov Milica, Ivana Lakić, Sandra Nikolić

Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Autor za kontakt: [milosevicnina@gmail.com](mailto:milosevicnina@gmail.com)

### Apstrakt

Babesioza je parazitska bolest rasprostranjena širom sveta uzrokovana protozoama iz roda *Babesia*, koje prenose krpelji, a koje se u organizmu prijemčivog i infestiranog domaćina razmnožavaju u eritrocitima. Babesiozu pasa izazivaju vrste *Babesia canis* i *Babesia gibsoni*, pri čemu je vrsta *B. canis* podeljena na tri podvrste. Kod pasa obolelih od babesioze, primarne hematološke abnormalnosti su trombocitopenija i anemija. Bez obzira o kojoj se Babeziji radi, sama patogeneza oboljenja je ista, a manifestuje se kliničkom slikom koja uključuje anemiju (usled imunološke reakcije razaranja eritrocita), povećanu telesnu temperaturu, apatiju, dehidraciju, oslabljen apetit, uvećanje limfnih čvorova, hemoglobinuriju, u težim slučajevima žuticu i prebojavanje sluznica, narandžast sadržaj u rektumu. Babesioza je praćena i multisistemskim poremećajima od akutnog respiratornog sindroma, cerebralnih znakova, ali i akutnog oštećenja bubrega. Abnormalnosti leukocita variraju od leukocitoze (sa i bez skretanja u levo) do leukopenije, neutrofilije, neutropenije, limfocitoze i/ili eozinofilije. Prevalenca akutnog otkazivanja bubrega kod ovog oboljenja je 2,2-36%. Pri kontroli bubrežne funkcije potrebno je ispitati serumske nivoe uree, kreatinina, kao i njihov odnos, proteine u mokraći, obim glomerularne filtracije, specifičnu težinu mokraće i prirodu sedimenta. Treba napomenuti da serumska urea uglavnom raste kada su u pitanju i drugi, prerenalni faktori-hemoliziranje eritrocita, obimna gastrointestinalna krvarenja, povećan unos proteina hranom, katabolički procesi koji su dominantni pri inflamatornim stanjima (pa tako i kod babesioze) praćeni destrukcijom proteina i posledičnim porastom uree u krvi. Pri tome se količnik urea:kreatinin znatno menja u korist uree, a promenu ovog količnika smo uočili i kod babesioze pasa. U proceni babesioze treba uzeti u obzir veći broj laboratorijskih parametara i ne treba se bazirati isključivo na nalazu babezije u krvnom razmazu, zbog mogućih komplikacija i primene potporne terapije. Ključne reči: psi, babesioza, hematologija, biohemija.

### Abstract

Babesiosis is a parasitic disease spread worldwide caused by tick-borne protozoa of the genus *Babesia*, which in the body of a susceptible and infested host multiply in erythrocytes. Dog babesiosis is caused by *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* species, with *B. canis* being divided into three subspecies. In dogs with babesiosis, thrombocytopenia and anemia are the primary hematologic abnormalities. Whatever the case of babesia, the pathogenesis of the disease is the same, manifested by a clinical picture that includes anemia (due to the immune response of destruction of erythrocytes), fever, apathy, dehydration, impaired appetite, enlargement of lymph nodes, hemoglobinuria, in severe cases jaundice and mucous membranes, orange content in rectum. Babesiosis is accompanied by multisystem disorders of acute respiratory syndrome, cerebral signs, but also acute renal impairment. Leukocyte abnormalities range from leukocytosis (with and without left turning) to leukopenia, neutrophilia, neutropenia, lymphocytosis and / or eosinophilia. The prevalence of acute renal failure in this disease is 2.2-36%. When controlling kidney function, it is necessary to examine serum levels of urea, creatinine, as well as their relationship, proteins in the urine, the extent of glomerular filtration, the specific gravity of the urine and the nature of the sediment. erythrocytes, extensive gastrointestinal bleeding, increased protein intake, catabolic processes that are dominant in inflammatory conditions (including babesiosis), followed by protein destruction and consequent increase in blood urea. In doing so, the urea ratio: creatinine changes significantly in favor of

urea, and a change in this ratio has been observed in canine babesiosis. The assessment of babesiosis should take into account a larger number of laboratory parameters and should not be based solely on the findings of babesia in blood smear, due to possible complications and the use of supportive therapy.

Key words: dog, babesiosis, hematology, biochemistry.

### **Etiologija babezioze kod pasa**

Babezioza je parazitska bolest rasprostranjena širom sveta uzrokovana protozoama iz roda *Babesia*, koje prenose krpelji, a koje se u organizmu prijemčivog i infestiranog domaćina razmnožavaju u eritrocitima. Babeziozu pasa izazivaju vrste *Babesia canis* i *Babesia gibsoni*, pri čemu je vrsta *B. canis* podeljena na tri podvrste, od kojih je *B. canis rossii* najpatogenija, dok su *B. canis canis* i *B. canis vogeli* manje patogene (Milešević i sar., 2005; Solano-Gallego i sar., 2016). Uzročnici babezioze kod pasa mogu biti i *B. conradae* (Kjemptur i sar., 2006), te *B. vulpes* (Baneth i sar., 2015) koja je ranije bila klasifikovana kao *Babesia* "španski izolat", *Babesia* "microti-slična vrsta", "*Babesia (Theileria) annae*", i "*Babesia* cf. *microti*" (Zahler i sar., 2000; Camacho-Garsia, 2006). U Evropi dominantnu ulogu ima *B. canis canis* koju prenosi *Dermacentor reticulatus* (Matijatko i sar., 2014). Babezioza pasa je prisutna u Srbiji već duže vreme i do sada su potvrđene *B. canis* i *B. gibsoni* (Davitkov i sar., 2015), a Gabrielli i sar. (2015) su pored ove dve vrste izolovali i *Babesia* sp. "španski izolat" i *B. microti*. Rađene su studije prevalencije babezioze na područjima grada Beograda i Novog Sada (Pavlović i sar., 2009; Potkonjak i sar., 2015) koje su pokazale visoku prevalenciju pasa zaraženih sa *B. canis*. Babezioza se kod pasa javlja u perakutnom, akutnom i hroničnom toku (Selanec i sar., 2012). Uobičajni klinički znaci babezioze su letargija, povraćanje, anoreksija, groznica, slabost, bledilo sluznica, žutica, splenomegalija, hematurija, dehidratacija, gubitak težine, bol u stomaku i osetljivost bubrega na palpaciju (Bastos i sar., 2004; Schoeman, 2009; Solano-Gallego i sar., 2011). Dijagnostika babezije je zasnovana na direktnim mikroskopskim metodama obojenih krvnih razmaza, molekularnim, kao i serološkim metodama od kojih su najznačajnije indirektna imunofluorescencija (IFAT) i enzimski imunotest (ELISA) (Solano-Gallego i sar., 2016).

### **Krvna slika kod pasa sa babezozom**

Kod pasa obolelih od babezioze, primarne hematološke abnormalnosti su trombocitopenija i anemija. Trombocitopenija je često prisutna, čak i kad je anemija odsutna (Furlanello i sar., 2005). Uzrok anemije su antigeni paraziti inkorporirani na površini eritrocita koji indukuju antigen prezentujuće ćelije, što dovodi do hemolize i uklanjanja zaraženih eritrocita od strane mononuklearno-fagocitnog sistema (Sykes, 2013). Abnormalnosti leukocita variraju od leukocitoze (sa i bez skretanja u levo) do leukopenije, neutrofilije, neutropenije, limfocitoze i/ili eozinofilije (Sykes, 2013).

Životinje i uzorkovanje: Istraživanjem je obuhvaćeno 25 pasa kod kojih je tokom 2015. i 2016. godine dijagnostikovana babezioza. Psi su poticali sa teritorije Novog Sada i njegove šire okoline. Među obolelim psima je bilo osam mešanaca (32%), tri rotvajlera (12%), dva labradora (8%), dva dobermana (8%), dva kane korsa (8%), jedan engleski mastif (4%), jedan nemačko – lovni terijer (4%), jedan dogo – argentino (4%), jedan maltezer (4%), jedan nemački ovčar (4%), jedan nemački špic (4%), jedan nemački kratkodlaki ptičar (4%) i jedan buldog (4%). Raspon starosne dobi pasa je bio od 6 meseci do 9 godina. Prosek starosne dobi pasa je bio 3,5 godine. Muških pasa obolelih od babezioze je bilo 17 (68%), a ženskih 8 (32%).

Dijagnostika: Dijagnostika babezioze rađena je pomoću direktnog mikroskopskog pregleda obojenih krvnih razmaza. Razmazi krvi su pravljani punkcijom ušne vene, a zatim direktnim nanošenjem krvi na pločicu. Krv se zatim laganim i kontinuiranim pokretima druge pločice ravnomerno razmazivala. Krvni razmazi su bojani metodama *May-Grünwald-Giemsa* (Kit RAL 555, Cosmos biomedical, Derbišir, Velika Britanija) ili *Diff Quick* (Bio – Diff Kit, BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska). Obojeni krvni razmazi su pregledali na svetlosnom mikroskopu BA210 Binocular, sa dodatkom kamere Moticam 580INT, (Motic<sup>®</sup>, Hong Kong, Kina).

Hematološke analize: Krv za hemogram uzimana je od pretraživanih pasa venskom punkcijom sa žutom iglom 20G (*v. jugularis externa*; *v. cephalica antebrachii*) i prikupljena je u epruvetu s antikoagulansom, etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Neposredno nakon uzimanja uzorka hemogram je odrađen hematološkim analizatorom Vet ABC (Scil, Virnhajm, Nemačka).

Zastupljenost hematoloških laboratorijskih promena kod pasa sa babezijom u našim kliničkim istraživanjima prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1: Zastupljenost pasa na babeziozu sa povišenim, normalnim i sniženim krvnim parametrima (25 pasa)

Hematološki parametar	Referentna vrednost	Broj (%) pasa iznad referentne vrednosti	Broj (%) pasa u okviru referentne vrednosti	Broj (%) pasa ispod referentne vrednosti
WBC ( $10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	5 - 14	8 (32)	10 (40)	7 (28)
LYM ( $10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	8 - 21	0 (0)	1 (5)	20 (95)
MON ( $10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	0,1 – 1,4	0 (0)	18 (86)	3 (14)
GRA ( $10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	3 - 10	9 (43)	9 (43)	3 (14)
RBC ( $10^6 \text{ mm}^{-3}$ )	4,95 – 7,87	1 (4)	14 (56)	10 (40)
HGB (g dL <sup>-1</sup> )	11,9 – 18,9	1 (4)	12 (48)	12 (48)
HCT (%)	35 – 57	0 (0)	8 (32)	17 (68)
PLT ( $10^3 \text{ mm}^{-3}$ )	211 – 621	0 (0)	6 (24)	19 (76)
MCV ( $\mu\text{m}^{-3}$ )	66 - 77	0 (0)	3 (12)	22 (88)
MCH (pg <sup>-1</sup> )	21 – 26,2	1 (4)	21 (84)	3 (12)
MCHC (g dL <sup>-1</sup> )	32 – 36,3	14 (56)	11 (44)	0 (0)
RDW (%)	11 - 14	17 (81)	0 (0)	4 (19)
MPV ( $\mu\text{m}^{-3}$ )	6,1 – 10,1	2 (10)	19 (90)	0 (0)

### Funkcionalni status bubrega kod pasa sa babezijom

Bez obzira o kojoj se Babeziji radi, sama patogeneza oboljenja je ista, a manifestuje se kliničkom slikom koja uključuje anemiju (usled imunološke reakcije razaranja eritrocita), povećanu telesnu temperaturu, apatiju, dehidrataciju, oslabljen apetit, uvećanje limfnih čvorova, hemoglobinuriju, u težim slučajevima žuticu i prebojavanje sluznica, narandžast sadržaj u rektumu. Babezioza je praćena i multisistemskim poremećajima od akutnog respiratornog sindroma, cerebralnih znakova, ali i akutnog oštećenja bubrega. Oštećenje bubrega (blaže i reverzibilno) bez kompletnog otkazivanja bubrega je veoma često kod babezioze pasa (Lobetti and Jacobson, 2001). Otkazivanje bubrega, ukoliko se dokaže, predstavlja nepovoljan prognostički znak, uglavnom završava fatalno, pa je veoma važno pratiti bubrežnu funkciju kod ovog oboljenja (Lobetti and Jacobson, 2001; Welzl et al., 2001). Prevalenca akutnog otkazivanja bubrega kod ovog oboljenja je 2,2-36% (Camacho et al., 2004; Garcia, 2006; Jacobson and Clark, 1994; Mathe et al., 2006). Pri kontroli bubrežne funkcije potrebno je ispitati serumske nivoe uree, kreatinina, kao i njihov odnos, proteine u mokraći, obim glomerularne filtracije, specifičnu težinu mokraće i prirodu sedimenta (Miyagawa et al., 2009). Treba napomenuti da serumska urea uglavnom raste kada su u pitanju i drugi, prerenalni faktori-hemoliziranje eritrocita, obimna gastrointestinalna krvarenja, povećan unos proteina hranom, katabolički procesi koji su dominantni pri inflamatornim stanjima (pa tako i kod babezioze) praćeni destrukcijom proteina i posledičnim porastom uree u krvi. Pri tome se količnik urea:kreatinin znatno menja u korist uree, a promenu ovog količnika smo uočili i kod babezioze pasa (De Scally et al., 2004; Mohr et al., 2000; Prause and Grauer, 1998; Simao et al., 2003). Mnogo je verovatnije da će serumska urea rasti baš zbog ovih prerenalnih faktora, dok serumski kreatinin raste ukoliko postoji

oštećenje bubrega (i to gubitak 2/3 ukupne bubrežne funkcije) (Pekmezci et al., 2015). Rezultati ispitivanja pokazuju da je kod 12 pasa (92,3%) koncentracija uree bila iznad referentnih vrednosti, dok je porast vrednosti kreatinina utvrđen kod dva psa (15,4%). Vrednost uree i kreatinina pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju. Količnik urea:kreatinin je bolje povezan sa vrednostima uree, nego sa vrednostima kreatinina sa kojima pozitivno korelira.

Zastupljenost promena u koncentraciji uree, kreatinina i njihovog odnosa kod pasa sa babezozom u našim kliničkim istraživanjima prikazana je u tabeli 2 i 3.

Tabela 2: Vrednost uree i kreatinina kod pasa sa babezozom

	U okviru referentne vrednosti		Iznad referentne vrednosti	
	Broj slučajeva	%	Broj slučajeva	%
Urea	1	7,7	12	92,3
Kreatinin	11	84,6	2	15,4

Tabela 3: Izmerene vrednosti uree, kreatinina i odnosa urea:kreatinin kod pasa sa babezozom

Slučaj broj	Urea mg/dl	Kreatinin mg/dl	Urea: Kreatinin
1	102,00	1,03	35,00
2	105,00	1,07	50,00
3	131,00	1,45	90,34
4	62,80	0,91	68,86
5	52,30	0,88	59,70
6	104,00	1,83	56,83
7	39,50	0,74	53,23
8	50,00	0,94	53,02
9	90,70	1,80	50,39
10	25,40	0,59	42,76
11	43,40	1,04	41,73
12	35,10	1,09	32,20
13	35,00	1,00	35,00

### Zaključak

U proceni babezioze treba uzeti u obzir veći broj laboratorijskih parametara i ne treba se bazirati isključivo na nalazu babezije u krvnom razmazu, zbog mogućih komplikacija i primene potporne terapije.

### Litearuta

1. Almy, F. S., Christopher, M. M., King, D. P., Brown, S. A., 2002. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Vet. Int. Med.*, 16: 45-51.
2. Antogni, M. T., Siepi, D., Porciello, F., Fruganti, G., 2005. Use of serum cystatin C determination as a Marker of renal function in the dog. *Vet Res Comm*, 29:265-267.
3. Antogni, M. T., Siepi, D., Porciello, F., Rueca, F., Fruganti, G., 2007. Serum cystatin C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency. *Vet Res Comm*, 31: 269-271.
4. Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L. 2015. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors*. 8: 207-2012.

5. Bastos, E. V., Moreira, S., Passos, L., Friche, M. 2004. Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026: 158-160.
6. Birkenhauer, A. J., Correa, M. T., Levy, M. G., Breitschwerdt, E. B., 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *Journ. Of American Vet. Med. Ass.*, 227:942-947
7. Burchard, G. D., Ehrhardt, S., Mockenhaupt, F., Mathieu, A., Agana-Nsiire, P., Anemana, S. D., Otchwemah, R. N., Abel, W., Brattig, N., 2003. Renal dysfunction in children with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Tamale, Ghana. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97: 345-350.
8. Camacho, A. T., Guitian, E. J., Pallas, E., Gestal, J. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K., Telford, S. R., Spielman, A., 2004. Azotemia and mortality among Babesia microti-like infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 18:141- 146.
9. Camacho-Garcia, A.T. 2006. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol.* 138: 97-102.
10. Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., Stanimirović, Z. 2015. Clinical babesiosis and molecular identification of Babesia canis and Babesia gibsoni infections in dogs from Serbia. *Acta Vet Hung.* 63: 199-208.
11. De Scally, M. P., Leisewitz, A. L., Lobetti, R. G., Thompson, P. N., 2006. The elevated serum urea:creatinine ratio in canine babesiosis in S. Africa is not of renal origin. *S. Af. Vet. Ass.*, 77(4): 175-178.
12. Fabisiak, M., Sapierzynski, R., Klucinski, W. 2010. Analysis of haematological abnormalities observed in dogs infected by a large Babesia. *Bull Vet Inst Pulawy.* 54: 167-170.
13. Finco, D. R., 1997. Evaluation of renal functions. *Canine and Feline nephrology and urology.* Philadelphia: 216-229.
14. Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L. 2005. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol.* 134: 77-85.
15. Gabrielli, S., Otasevic, S., Ignjatovic, A., Savic, S., Fraulo, M., Arsić-Arsenijević, V., Momcilovic, S., Cancrini, G. 2015. Canine babesioses in noninvestigated areas of Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15: 535-538.
16. Garcia, A. T., 2006. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet. Parasitol.*, 138,97-102.
17. Georgi, J. R., Georgi, M. E., 1992. *Canine Clinical Parasitology.* Lea & Febiger, Philadelphia, Pa, USA.
18. Gunther, A., Grobusch, M. P., Slevogt, H., Abel, W., 2002. Renal dysfunction in falciparum-malaria is detected more often when assessed by serum concentration of cystatin C instead of creatinine. *Top. Med. And Inter. Health*, 7: 931-934
19. Hossain, M. A., Yamato, O., Yamasaki, M., Jeong, J. R., Chang, H. S., Maede, Y. 2003. Serum from dogs Infected with Babesia gibsoni inhibits maturation of reticulocytes and erythrocyte 5'-nucleotidase activity in vitro. *J Vet Med Sci.* 65: 1281-1286.
20. Jacobson, L. J., Clarck, I., 1994. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *J S Afr Vet Assoc*, 65:134-145.
21. Jensen, A. L., Bomholt, M., Moe, L., 2001. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, 30: 86-90.
22. Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A. 2006. Babesia conradae, sp. nov., a small canine Babesia identified in California. *Vet Parasitol.* 138: 103-111.
23. Krishnan, A., Karnad, D. R., 2003. Severe falciparum malaria: an important cause of multiple organ failure In Indian intensive care unit patients. *Critical Care Medicine*, 31: 2278-2284.
24. Lakić, I. 2017. Thrombocytopenia in dogs with babesiosis. *Zbornik 41. Smotra naučnih radova studenata poljoprivrede i veterinarske medicine, Novi Sad*, in press.
25. Lobetti, R. G., Jacobson, L. S., 2001. Renal involvement in dogs with babesiosis. *Journal of the South African Vet. Assos.*, 72:23-28
26. Maitland, K., Pamba, A., English, M., Peshu, N., Marsh, K., Newton, C., Levin, M., 2005. Randomized trial of volume expansion with albumin or saline in children with severe amlaria: preliminary evidence of albumin benefit. *Clin. Inf. Dis.*, 40: 538-545.
27. Mathe, A., Voros., K., Papp, L., Reiczigel, J., 2006. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung.* 54:367-385.
28. Matijatko, V., Torti, M., Ki, I., Šmit, I., Štokovic, I., Vranješ-Đuric, S., Milanović, S., Mrljak, V., Brkljačić, M. 2014. 'Serum cortisol and insulin concentrations in dogs naturally infected with Babesia canis'. *Vet Arh.* 84: 551-562.
29. Matijila, P. T., Leisewitz, A. L., Jongejan, F., Penzhorn, B. L., 2008. Molecular detection of tick borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasit.*, 155: 152-157

30. Milešević, M., Ekert, M., Mahnik, M., Pinter, L., Hajsig, D. 2005. Babezioza pasa - opis i analiza kliničkih slučajeva, *Praxis veterinaria*, 53: 121-126.
31. Miyagawa, Y., Takemura, N., Hirose, H., 2009. Evaluation of measurement of serum cystatine-C by an enzyme linked immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Med Sci*, 71: 1169- 1176.
32. Mohr, A. J., Lobetti, R. G., Van Der Lugt, J. J., 2000. Acute pancreatitis : a newly recognized potential complication of canine babesiosis. *Journal of the South African Vet. Assoc.*, 71:232-239.
33. Muhlnickel, C. J., Jeffries, S. R., Morgan-Ryan, U. M., Irwin, P. J., 2002. Babesia gibsoni infection in three dogs in Victoria, *Australian Vet. Jour.*, 80:606-610.
34. Naqvi, R., Ahmad, E., Akhtar, F., Rizivi, A., 2003. Outcome in severe acute renal failure associated with malaria. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 18: 1820-1823.
35. Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y. 2001. Increased generation of superoxide in erythrocytes infected with Babesia gibsoni. *J Vet Med Sci*. 63: 1077-1081.
36. Pavlović, I., Petković, D., Terzin, V., Terzin, D., Vojinović, D. 2009. Babesiosis of dogs at Belgrade area in period 2004–2008. 10<sup>th</sup> Epizootiology Days with International Participation, 1–4 April, Serbia.
37. Pekmezci, D., Ural, K., Aysul, N., Guzel, M., Ciftci, G., 2014. Assesment of renal function using canine cystatin-c levels in canine babesiosis and ehrlichiosis. *Acta Veterinaria Beograd*, 65 (1), 56-65.
38. Potkonjak, A., Vračar, V., Novakov, N., Stevančević, O., Stojanac, N., Šavić, S., Petrović, A., Jurišić, A., Rajković, D., Bursać, A., Lukić, B., Gerilovych, A. 2015. Seroepidemiological research of babesiosis in dogs in the area of Novi Sad, Autonomous province of Vojvodina, Republic of Serbia. *JVMBBS*. 1: 22-24.
39. Prause, L. C., Grauer, G. F., 1998. Association of gastrointestinal hemorrhage with increased blood urea nitrogen and BUN/creatinine ratio in dogs: a literature review and retrospective study. *Veterinary Clinical Pathology*, 27: 107-111.
40. Salem, N. Y. and Farag, H. S. 2014. Cilinical, Hematologic, and Molecular Findings in Naturally Occuring Babesia Canis vogeli in Egyptian dogs. *Veterinary Medicine International*, Vol. 2014, Article ID 270345, st 6.
41. Schetters, T. P., Kleuskens, J., Scholtes, N., Gorenflot, A., 1998. Parasite localization and dissemination in the Babesia infected host. *Annals of Trop. Med. And Parasit.*, 92: 513-519.
42. Schoeman, J. P. 2009. Canine babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76:59-66.
43. Selanec, J., Torti, M., Šmit, I., Mayer, I., Kuleš, J., Jović, I., Mrljak, V. 2012. New understandings on canine babesiosis. *Veterinarska stanica*. 43: 497-505.
44. Simao, C., Stone R., Almeida, M., 2003. Kidney failure associated with Plasmodium falciparum infection. *Acta medica Portuguesa*, 16: 93-35.
45. Solano-Gallego, L., Sainz, A., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors*. 9: 336.
46. Sykes, J.E. 2013. *Canine and feline infectious diseases*. Elsevier, Amsterdam.
47. Ulienbergh, G., Franssen, F. F., Perie, N. M., Spanjier, A. A., 1989. Three groups of Babesia canis Distinguished and a Proposal for Nomenclature. *Vet. Quarterly*, vol. 11, No. 1, pp. 33-40.
48. Welzl, C., Leisewitz, A. L., Jacobson, L. S., Vaughan-Scott, T., Myburgh, E., 2001. Systemic inflammatory Response syndrome and multiple-organ damage/Dysfunciton in complicated canine babesiosis. *Journal of the South African Vet. Ass.*, 72:158-162.
49. Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R. 2000. Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs. *Vet Parasitol*. 89: 241–248.
50. Zinna, S., Vathsala, A., Woo, K. T., 1999. A case series of falciparum malaria-induced acute renal failure. *Annals of the Academy of medicine, Singapore*, 28: 578-582.
51. Zygnier, W., Rapacka, G., Gójska-Zygnier, O., Długosz, E., Wedrychowicz, H. 2006. Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large Babesia in Warsaw (Poland). *Pol J Vet Sci*. 10: 245-253.



## **PRIMENA HEMOKULTURE U KONTROLI KVALITETA KRVI OVNOVA ZA SPRAVLJANJE MIKROBIOLOŠKIH PODLOGA**

Aleksandar Potkonjak\*, Marko R. Cincović, Branislava Belić, Ivana Lakić

*Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

\*Autor za kontakt: [ale@polj.uns.ac.rs](mailto:ale@polj.uns.ac.rs)

### **Apstrakt**

U proizvodnji standardnog krvnog agara za neselektivnu kultivaciju i izolaciju bakterija koristi se najčešće krv ovnova. Ponekad patogene bakterije mogu biti prisutne u krvi ovnova, što je ređi slučaj, dok su saprofitne bakterije i njihove spore uvek prisutne na koži i/ili dlaci životinja, kao i u okruženju, pa teorijski postoji nekoliko kritičnih tačaka za bakteriološku kontaminaciju krvi i posledično izlivanje bakteriološki kontaminiranog krvnog agara. Prvi kritična tačka je prisutna tranzitorna bakterijemija ili septično stanje kod ovnova, kao posledica čestih venepunkcija ili primarnog infektivnog oboljenja. Ovakva stanja bi morala da se ogledaju sa promenom opšteg stanja uz hiperpireksiju i poremećajem hematoloških i biohemijskih parametara u krvi. Druga kritična tačka je venepunkcija, odnosno neadekvatna priprema kože. Treća kritična tačka za bakteriološku kontaminaciju je tehnološki proces sa prikupljenom krvi sve do momenta izlivanja u pripremljenu i sterilnu bazu za krvni agar. Primena osetljivog metoda za kontrolu sterilnosti prikupljenje krvi (hemokultura) može da spreči pojavu bakteriološke kontaminacije izlivenih krvnih ploča. Sa bakteriološkog aspekta najkritičnija je venepunkcija, zbog uvek prisutne fiziološke flore kože i dlake.

Ključne reči: krv, kontaminacija, hemokultura.

### **Abstract**

The production of standard blood agar for the indiscriminate cultivation and isolation of bacteria is most commonly used in rams' blood. Sometimes pathogenic bacteria can be present in rams' blood, which is less the case, while saprophytic bacteria and their spores are always present on the skin and / or hair of animals, as well as in the environment, so theoretically there are several critical points for bacteriological contamination of the blood and subsequent bacteriological leakage. contaminated blood agar. The first critical point is the presence of transient bacteremia or septic conditions in rams, as a result of frequent venipuncture or primary infectious disease. Such conditions would have to be mirrored by a change in general condition with hyperpyrexia and disruption of haematological and biochemical parameters in the blood. Another critical point is venipuncture, that is, inadequate skin preparation. The third critical point for bacteriological contamination is the technological process with the blood collected until it is poured into a prepared and sterile blood agar base. The use of a sensitive method for controlling sterility blood collection (chemoculture) can prevent bacteriological contamination of spilled blood vessels. From the

bacteriological point of view, the most critical is venipuncture, because of the ever-present physiological flora of skin and hair.

Key words: blood, contamination, hemoculture.

### **Definicija i osobine krvnog agara**

Columbia Blood Agar je hranljivi agar opšte namene formulisan od strane Ellner-a i sar. (1) 1966; dalje je on obogaćen dodavanjem sterilne krvi. Uobičajeno, baze krvnog agara su uključivale hidrolizat kazeina za brzu produkciju velikih kolonija ili mesni infuzum, koji daje definisane hemolitičke reakcije. Columbia Agar kombinuje oba dodatka, da bi se dobile poboljšane karakteristike. Ova podloga sa dodatim specijalnim peptonom omogućava brz i obilan rast visoko izbirljivih i neizbirljivih organizama. Takođe, ova podloga pokazuje tipičnu kolonijalnu morfologiju; bolju proizvodnju pigmenta i jače definisane hemolitičke reakcije. Columbia Agar podloga se koristi kao osnova za podloge, koje sadrže krv i za selektivne oblike podloga u kojima se kao aditivi koriste različite kombinacije antimikrobnih dodataka. Fildes je otkrio da se obogaćivanjem Hranljivog agara ovčijom krvi obezbeđuju oba ova faktora i da tada podloga podržava rast H. influenzae. Kukuruzni skrob služi kao izvor energije i takođe neutrališe toksične metabolite. Ovčija krv omogućava detekciju hemolize i takođe obezbeđuje hem (X faktor), koji je neophodan za rast mnogih bakterija. Bez obzira, zbog nedostatka V faktora (nikotinamid adenin dinukleotid), Haemophilus influenzae neće rasti na ovoj podlozi, jer su mu potrebni i X i V faktor. Pošto ova podloga ima relativno visok sadržaj ugljenih hidrata, beta-hemolitičke streptokoke mogu pokazati zelenkastu hemolitičku reakciju, koja se može zameniti sa alfa-hemolizom. Neophodno je zbog toga, izvršiti potvrdne testove svih kolonija.

### **Hemokultura – principi izvođenja i interpretacije**

Uzorak za hemokulturu je venska krv. Uzimanje i analiza uzoraka krvi iz arterije neće povećati uspešnost izolacije mikroorganizama iz krvi. Prema svetski priznatim postojećim preporukama iz humane medicine nije preporučljivo uzimati uzorak krvi iz intravenskog katetera, jer tako dobijeni uzorci pokazuju povećanu učestalost kontaminacije i lažno pozitivnih rezultata.

Kultivisanje odgovarajuće zapremine krvi je najvažniji pojedinačni faktor koji određuje stopu izolacije bakterija iz krvi. Razlog leži u tome što većina odraslih ljudi sa bakterijemijom ima niske koncentracije cirkulišućih mikroorganizama u krvi. Čak 50% pacijenata ima <1,0 CFU ( od engl., colony forming units) po mililitru krvi. Svaki dodatni mililitar krvi, povećava stopu izolacije za 3%. Preporučeni volumen krvi: 10 ml po jednoj bočici (ukupno 20 ml po jednom setu).

Postupak prikupljanja uzoraka krvi za hemokulturu - Krv se uzima iz v.jugularis, obostrano u dva seta za hemokulturu. Jedan od važnih činilaca, koji povećavaju osetljivost hemokulture u otkrivanju bakterijemije je tehnika uzimanja uzoraka krvi, uključujući dezinfekciju kože po pravilima asepsa i pravilno vađenje krvi venepunkcijom.

Nakon što se uklone plastični poklopci sa bočica za hemokulturu, gumeni čep treba očistiti brisanjem dezinfekcionim sredstvom, te ostaviti dok primenjeno sredstvo ne ispari u potpunosti. Za dezinfekciju gumenih čepova na bočicama za hemokulture treba koristiti alkohol. Jod kao sredstvo ne sme da se koristi za tu namenu, jer prema proizvođačima, može dovesti do propadanja gumenog materijala.

Pre početka venepunkcije, potrebno je pripremiti i proveriti sav potreban materijal. Nakon uobičajene higijene ruku veterinarara ili veterinarskog tehničara, sledi higijena odabranog mesta za venepunkciju. Vidljivo zaprljana mesta na koži, koja nisu očišćena a predviđena za venepunkciju, potrebno je oprati vodom i sapunom. Mesto venepunkcije treba dezinfikovati odgovarajućim antiseptičkim sredstvom, te pričekati da primenjeno sredstvo u potpunosti izvetri i koža bude suva. Nakon dezinfekcije kože, mesto uboda se više ne sme palpirati, osim ako se ne koriste sterilne rukavice. Nakon obavljene venepunkcije, pribor za uzimanje krvi obavezno se odbacuje u odgovarajuću kanticu za oštar otpad.

Bočice za hemokulturu sadrže tekuće hranjive podloge specijalizovane za rast i kultivaciju određenih bakterija. Bočice se do upotrebe čuvaju na suvom i hladnom mestu (2-25°C), zaštićenom od sunčeve svetlosti. Krv dobijena venepunkcijom direktno se inokulira u dve bočice u podjednakom odnosu volumena krvi. Aerobna bočica podržava rast obligatorno aerobnih i fakultativno anaerobnih mikroorganizama. Sadržaj anaerobne bočice je takav da podržava rast obligatorno anaerobnih i fakultativno anaerobnih organizama. U pojedinu bočicu aseptički se inokulira 8 - 10 mL venske krvi. Da bi se sprečilo zgrušavanje, inokulirane bočice treba lagano zaokrenuti nekoliko puta radi mešanja krvi sa tekućom hranjivom podlogom. Nakon toga, bočice bi trebalo transportovati što je brže moguće u laboratoriju, a preporuke proizvođača su da ne prođe više od dva sata.

Automatizovani uređaji za kontinuirano praćenje hemokultura – Uređaji za hemokulturu predstavljaju u potpunosti automatizovani sistem, koji kontinuirano prati hemokulture i detektuje rast mikroorganizama u uzorcima. Bočice se inkubiraju u uređaju i periodično kontrolišu na znakove rasta bakterija. Svaka bočica sadrži senzor, koji reaguje na porast koncentracije CO<sub>2</sub> ili pad koncentracije O<sub>2</sub>. Mikroorganizmi CO<sub>2</sub> proizvode metabolizmom hranjivih materija u bočici, a O<sub>2</sub> koriste za svoj rast i deobu. Uređaj prekontrolise senzor svakih deset minuta tragajući za porastom u njegovoj fluorescenciji. Porast u fluorescenciji je srazmeran povećanju količine CO<sub>2</sub> ili smanjenju količine O<sub>2</sub> prisutnog u bočici. Nakon što je uređaj signalizirao rast bakterija, pozitivna bočica se vadi iz uređaja, posebno u daljem postupku treba voditi računa o merama opreza pri rukovanju bočicama, osigurati aseptične uslove, te uzorke odložiti u biološki sigurnu okolinu. Uzorak iz bočice sada se koristi za pripremu mikroskopskog preparata, koji se boji po Gramu. Na temelju Gram preparata i kliničkih podataka o pacijentu radi se preliminarna dijagnoza bakterijemijske etiologije, a rezultat prosleđuje odgovornom doktoru. Nakon ovih postupaka, treba dalje vršiti kultivisanje uzoraka na hranljivim podlogama za rast bakterija radi konačne identifikacije uzročnika i izrade antibiograma.

Rezultati pozitivne hemokulture ponekad se lako tumače, ali često predstavljaju pravi izazov za interpretaciju. Laboratorijski nalaz i njegovu kliničku važnost uvek treba proceniti u odnosu na kliničku sliku pacijenta. Postoji nekoliko faktora, koji utiču na tačnu interpretaciju rezultata. Za početak, identitet mikroorganizma izolovanog iz pozitivne hemokulture ima određenu prediktivnu vrednost. Uobičajeni krvni izolati, koji uvek predstavljaju pravu bakterijemiju su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Drugi mikroorganizmi poput *Corynebacterium* spp. i *Cutibacterium* (ranije poznat kao *Propionibacterium* spp.) uvek predstavljaju kontaminaciju. Detekcija viridans-grupe streptokoka, koagulaza-negativnih stafilokoka i enterokoka, još uvek je problematična za tumačenje, budući da su neke studije pokazale da mogu predstavljati pravu bakterijemiju u 38%, 15% i 78% slučajeva. Uzorak pozitiviteta hemokultura ima vrednost pri određivanju kliničkog značaja izolata. Kada su većina ili sve hemokulture dobijene nezavisnim venepunkcijama pozitivne na isti mikroorganizam, verovatnoća da ovo predstavlja pravu bakterijemiju je izuzetno visoka, bez obzira na identitet organizma. To je slučaj kod stanja kod kojih je

bakterijemija kontinuirana poput endokarditisa i drugih intravaskularnih infekcija. Sa druge strane, prisutnost samo jednog pozitivnog seta hemokulture od nekoliko uzetih za analizu ukazuje da pozitivan nalaz predstavlja kontaminaciju. Ukoliko i dalje nismo sigurni predstavlja li izolovani mikroorganizam klinički značajan nalaz ili ne, još jedan elemenat, koji pomaže u tumačenju nalaza je tzv. "diferencijalno vreme do pozitivnosti". To je vreme proteklo od kada je uzet uzorak venske krvi za hemokulturu do pozitivnog rezultata u automatizovanom termostatu. Kada se izoluje sumnjiv nalaz iz uzorka, treba posumnjati na kontaminaciju ako je bilo potrebno više od 48-72 sata da mikroorganizmi porastu, ukoliko su prisutni u malim količinama. Kada se ti isti patogeni detektuju u manje od 24 do 48 sati od trenutka kada je uzeta krv, verovatnost da su pravi uzročnici bakterijemije ipak postoji. Diferencijalno vreme do pozitivnosti koristi se takođe da bi se potvrdilo da li je kateter izvor infekcije. Analiziraju se dva seta hemokultura, jedan uzet perifernom venepunkcijom, a drugi iz intravaskularnog katetera. Ako je hemokultura uzeta na jednom mestu pozitivna najmanje 90-120 minuta pre nego hemokultura uzeta na drugom anatomskom mestu (venepunkcijom ili iz katetera), rezultati ukazuju da mesto sa ranijim pozitivitetom ima veću koncentraciju organizama i da je izvor infekcije.

### Rezultati hemokulture krvi ovnova

U proizvodnji standardnog krvnog agara za neselektivnu kultivaciju i izolacija bakterija koristi se najčešće krv ovnova. Ponekad patogene bakterije mogu biti prisutne u krvi ovnova, što je ređi slučaj, dok su saprofitne bakterije i njihove spore uvek prisutne na koži i/ili dlaci životinja, kao i u okruženju, pa teorijski postoji nekoliko kritičnih tačaka za bakteriološku kontaminaciju krvi i posledično izlivanje bakteriološki kontaminiranog krvnog agara. Prvi kritična tačka je prisutna tranzitorna bakterijemija ili septično stanje kod ovnova, kao posledica čestih venepunkcija ili primarnog infektivnog oboljenja. Ovakva stanja bi morala da se ogledaju sa promenom opšteg stanja uz hiperpireksiju i poremećajem hematoloških i biohemijskih parametara u krvi. Druga kritična tačka je venepunkcija, odnosno neadekvatna priprema kože. Treća kritična tačka za bakteriološku kontaminaciju je tehnološki proces sa prikupljenom krvi sve do momenta izlivanja u pripremljenu i sterilnu bazu za krvni agar. Primena osetljivog metoda za kontrolu sterilnosti prikupljenje krvi može da spreči pojavu bakteriološke kontaminacije izlivenih krvnih ploča. Sa bakteriološkog aspekta najkritičnija je venepunkcija, zbog uvek prisutne fiziološke flore kože i dlake. Fiziološka mikroflora sadrži mnogo različitih bakterijskih vrsta, a kada govorimo o koži, životinje imaju različitu fiziološku floru u odnosu na uslove smeštaja i uslove okoline. Najčešće su to stafilokoke i mikrokoke. Dok druge vrste poput *Bacillus* spp. dospevaju na dlaku i kožu iz okruženja. Prema istraživanjima najčešće vrste bakterija prisutne na koži ovaca su *Staphylococcus* spp. (30.43%), *Bacillus* spp. (26.97%), *Streptococcus* spp. (16.89%), Gram-negativni fermentori (6.3%) i *Moraxella* spp. (5.14%) (referenca: Haarstad, A. C., Eisenschenk, M. C., Heinrich, N. A., Weese, J. S., & McKeever, P. J. (2014). Isolation of bacterial skin flora of healthy sheep, with comparison between frequent and minimal human handling. *Veterinary dermatology*, 25(3), 215-e56). Primenom asepsa i antiseptične pripreme venepunkcije i prikupljanja krvi potpuno se uklanja mogućnost bakteriološke kontaminacije krvi.

Cilj: Ustanoviti izvore bakteriološke kontaminacije u toku prikupljanja i obrade krvi.

Materijal i metod: Prikupljena je krv od dve grupe po 4 ovna (ukupno 8 ovnova) primenom venepunkcije *v. jugularis*. Kod prve grupe ovnova koža je pripremljena šišanjem, pa dezinfekcijom prvo sa 70% izopropanol i 0,1 % butandiol (Skin-Des®, Antiseptica chem. pharm. Produkte GmbH), a potom polivinilpirolidon uz upotrebu sterilne gaze i kružno brisanje od centra prema spolja, bez naknadne palpacije vene i uz upotrebu sterilnih hirurških rukavica. Kod druge grupe ovnova koža je pripremljena bez dodatnih mera, prema procedure onoga koji vadi krv. Od svakog pojedinačnog ovna, aseptično je uzeto po 10 mL pune krvi i kultivisano u bocu sa podlogom, odnosno ukupno 40 mL jer su primenjena dva seta za hemokulturu (aerobno i anaerobno), a venepunkcija je bila urađena iz leve i desne *v. jugularis*. Takođe, prikupljena je krv iz 2 zbirne boce, primenom šprica i igle, neposredno nakon izlivanja krvnog agara. Bila su primenjena dva seta za hemokulturu. Setovi za hemokulturu su kultivisani na licu mesta i transportovani u laboratoriju prema preporukama proizvođača. Za kultivaciju je korišćen najosetljiviji

metod za hemokulture: BacT/ALERT® FN Plus, bioMérieux, sa delom za aerobne i anaerobne bakterije. Kod identifikovanog porasta izvršena je supkultivacija i identifikacija poraslih vrsta. Kultivacija i identifikacija bakterijskih vrsta je bila urađena u Službi za mikrobiološku dijagnostiku, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica.



Slika 1-2: Priprema uzimanja uzoraka krvi i bočice za hemokulturu sa pratećom zaštitnom i drugom opremom

Rezultati: U prvoj grupi ovnova, samo kod jednog ovna broj 0202 su bile izolovane sledeće vrste: *Staphylococcus epidermidis* (I set aerobno i anaerobno, desno) i *Staphylococcus xylosus* (II set anaerobno, levo). U drugoj grupi ovnova, kod ovna broj 0207 bio je izolovan *Bacillus subtilis* (I set anaerobno, desno), kod ovna broj 0231 izolovani su *Bacillus pumilis* (I set aerobno i anaerobno, desno) i *Staphylococcus auricularis* (II set aerobno i anaerobno, levo), kao i kod ovna broj 0248 izolovan je *Staphylococcus xylosus* (II set anaerobno, levo). Prvi uzorak krvi iz zbirne boce (A1 i A2M) je ostao bez bakterijskog porasta, dok je drugi uzorak krvi ostao sterilan. U prvoj grupi ovnova procenat pozitivnih je 25% (jedan ovna), dok je u drugoj grupi 75% (tri ovna). Identifikovani izolati su različiti uz ponavljanje vrste *Staphylococcus xylosus* kod dva ovna (0202 iz prve grupe i 0248 iz druge grupe). Ovna broj 0202 nije prošao test sterilnosti u postrojenjima ProReady, te je odbačen iz zbirnog uzorka.

Neke osobine izolovanih bakterija:

*Staphylococcus epidermidis* spada u koagulaza negativne stafilokoke. Živi uglavnom na koži i sluzokoži čoveka, gde pripada normalnoj bakterijskoj flori.

*Staphylococcus xylosus* je gram-pozitivna bakterija, koja formira nakupine ćelija. Kao i većina stafilokoknih vrsta, koagulaza je negativna i postoji kao zamena na koži ljudi i životinja i u okruženju.

*Staphylococcus auricularis* nalazi se uobičajeno na koži, a izolovana je iz ušnog kanala ljudi.

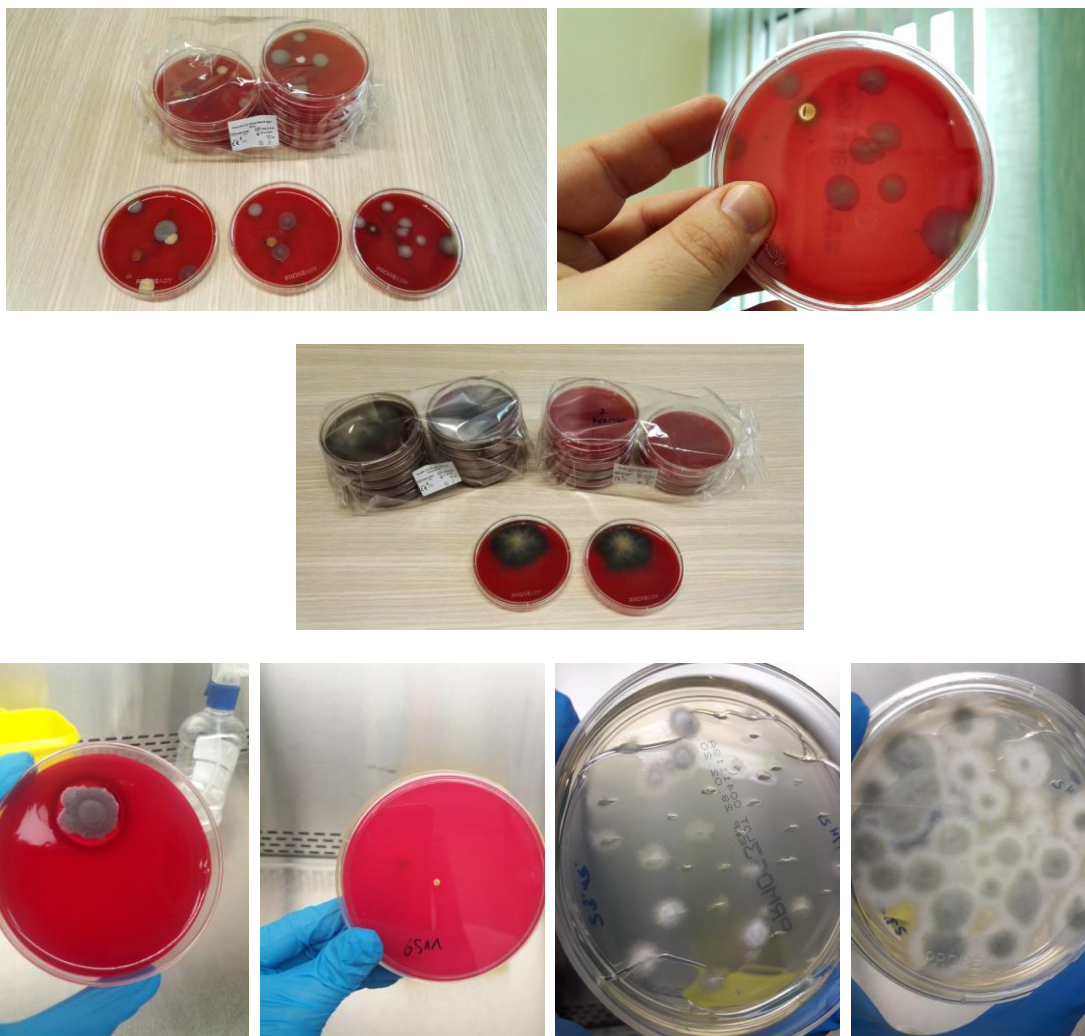
*Bacillus subtilis* poznat i kao travni bacil, je gram-pozitivna, katalazno pozitivna bakterija, koja se nalazi u zemlji i gastrointestinalnom traktu preživara i ljudi.

*Bacillus pumilis* je gram-pozitivan aerobni bacil, koji stvara spore i obično se nalazi u zemljištu. Spore *B. pumilis* - sa izuzetkom mutirajućeg soja ATCC 7061 - uglavnom pokazuju visoku otpornost na uticaje okoline, uključujući izlaganje UV svetlu, isušivanje i prisustvo oksidatora, kao što je vodonik peroksid.

Interpretacija: Na osnovu porasta bakterijskih vrsta u različitim setovima hemokultura i njihove identifikacije, kao i značajno prisutnijeg porasta u drugoj grupi ovnova može se sigurno zaključiti da se radi o kontaminaciji krvi bakterijama sa površine kože i dlake, odnosno sa bakterijama iz okoline ovnova, jer nisu dokazani primarno patogeni uzročnici u krvi i na koži/dlaci. Uzorak krvi iz zbirne boce je ostao bez porasta, što ukazuje da u toku proizvodnje nema izvora bakteriološke kontaminacije.

Preporuke: Primeniti asepsu i antisepsu prilikom venepunkcije. Kožu obavezno ošišati i obrijati u širokom krugu, pa oprati toplom vodom i rastvorom sapuna. Nakon sušenja sterilnom papirnom vatom, odmastiti rastvorom alkohola i etra, a potom naneti antiseptik 70% izopropanol i 0,1 % butandiol (Skin-Des®, Antiseptica chem. pharm. Produkte GmbH), ostaviti da deluje 3 minuta, a nakon brisanja sterilnom gazom, naneti polivinilpirolidon, pa ostaviti da deluje 3 minuta i obrisati sterilnom gazom. Brisanje se vrši

kružnim pokretom od centra (mesta uboda igle) prema spolja, kao i kada se priprema hirurško polje. Vena se ne sme ponovo palpirati zbog nove kontaminacije. Koristiti sterilne hirurške rukavice. Prikupljanje krvi obavljati u prostoriji sa redukovanim brojem bakterija (upotrebom uv lampi ili hepa filtera), posebno ako se u obzir uzme činjenica da su nađene i bakterije poreklom iz zemljišta ili sa trave u hemokulturi.



Slika 3-9: Izgled kontaminiranih podloga

### Zaključak

Ispitivanje hemokulture iz krvi životinja koje se gaje za spravljanje mikrobioloških podloga predstavlja interesantan i potencijalno nezamenjiv metod u proceni sterilnosti krvi. Potrebno je uraditi dodatna istraživanja i validacije primene ovih metoda na različitim kritičnim kontrolnim tačkama na kojima se krv nalazi od vađenja do momenta razlivanja u podloge. Adekvatnim vađenjem krvi i primenom mera dezinfekcije može se značajno uticati na smanjenje kontaminacije podloga.

### Zahvalnost

Rad je rezultat projekta finansiranog od Fonda za inovacionu delatnost.

**Literatura**

1. *BD Life Sciences – Diagnostic Systems CLSI formatted procedures. AUTOMATED BLOOD CULTURE BACTEC™ 9240/9120/9050 [Internet] Franklin Lakes, NJ : Becton, Dickinson and Company.*
2. *King TC, Price PB. An evaluation of iodophors as skin antiseptics. Surg Gynecol Obstet. 1963; 116:361–365. [PubMed: 14032870]*
3. *Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. Clin Microbiol Infect. 2013 Jun;19(6):513-20. doi: 10.1111/1469-0691.12180.*
4. *Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture–based diagnosis of bacteremia: state of the art. Clin Microbiol Infect 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>.*
5. *Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, et al. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. J Clin Microbiol 2008; 46:1381.*
6. *Strand CL, Wajsbort RR, Sturmman K. Effect of iodophor vs iodine tincture skin preparation on blood culture contamination rate. JAMA 1993; 269:1004.*
7. *Towns ML, Jarvis WR, Hsueh PR. Guidelines on blood cultures. J Microbiol Immunol Infect. 2010 Aug;43(4):347-9. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60054-0.*
8. *Washington, J. A. 1975. Blood cultures: principles and techniques. Mayo Clin. Proc. 50:91–97.*
9. *Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. Ii. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. Rev Infect Dis 1983; 5: 54–70.*
10. *Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24: 584–602.*
11. *Weinstein, M. P., L. B. Reller, J. R. Murphy, and K. A. Lichtenstein. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. Rev. Infect. Dis. 5:35–53.*
12. *Wilson ML, Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures: Approved guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.*

## **RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KOD FARMSKIH ŽIVOTINJA**

Zorana Kovačević, Miodrag Radinović

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

*\*kontakt: [zorana.kovacevic@polj.edu.rs](mailto:zorana.kovacevic@polj.edu.rs)*

### **Sažetak**

Proizvodnja na savremenim farmama životinja je visoko zavisna od upotrebe lekova kroz gotovo sve faze proizvodnje. Antibiotici tu zauzimaju prvo mesto po važnosti i učestalosti primene. Kao suštinski važni lekovi, antibiotici su namenjeni očuvanju zdravlja i dobrobiti životinja. Racionalna upotreba antibiotika je princip koji se mora ispoštovati da bi se ostvario njihov najbolji efekat, a izbegle štetne posledice pre svega prekomerne primene. U lošim zoohigijenski uslovima često se pribegava povećanoj primeni antibiotika sa ciljem da se na taj način očuva zdravstveni status životinja. Tada je teško izbeći prekomernu upotrebu ili zloupotrebu antibiotika koja posledično dovodi do nastanka i razvoja antimikrobne rezistencije. U cilju borbe protiv ovog javnog zdravstvenog problema u Globalnom akcionom planu Svetske zdravstvene organizacije (SZO) je istaknuta obuka svih zdravstvenih radnika o antimikrobnoj rezistenciji.

Ključne reči: antibiotici, antimikrobna rezistencija, farmske životinje.

### **Abstract**

Production on modern animal farms is highly dependent on the use of drugs through almost all stages of production. Antibiotics take the first place in terms of importance and frequency of application. As essential medicines, antibiotics are intended to preserve the health and welfare of animals. Rational use of antibiotics is a principle that must be followed in order to achieve their best effect and avoid harmful consequences, especially excessive use. In poor zoohygienic conditions, increased use of antibiotics is often resorted to in order to preserve the health status of the animals that consequently leads to the emergence and development of antimicrobial resistance. Then it is difficult to avoid excessive use or abuse of antibiotics. In order to combat this public health problem, the Global Action Plan of the World Health Organization (WHO) highlights the training of all healthcare workers on antimicrobial resistance.

Key words: antibiotics, antimicrobial resistance, farm animals.

### **Racionalna primena antibiotika**

Savremena stočarska proizvodnja podrazumeva gajenje velikog broja životinja na malom prostoru uz postizanje visokih proizvodnih rezultata i minimalnih gubitaka (1). Ovakav način proizvodnje predstavlja veliki izazov za veterinarsku službu da obezbedi dobar zdravstveni status životinja. Da bi se ovo postiglo često se pribegava upotrebi velikih količina antibiotika posebno na onim farmama gde su nepovoljni mikroklimatski uslovi, na farmama otvorenog tipa odnosno sve gde nepovoljan zdravstveni status onemogućava postizanje željenih proizvodnih rezultata (2). Naime, prevazilažnje nepovoljnih uslova smeštaja, ishrane, mikroklimata se pokušava prevazići primenom antibiotika. Zbog toga je praktično nemoguće zamisliti intenzivnu proizvodnju bez primene antibiotika kako u cilju terapije, tako i u profilaktičke svrhe (2,3). Kad je reč o govedarstvu, održavanje dobrog zdravstvenog statusa zahteva angažovanje struke i primenu terapeutika u različitim fazama proizvodnog ciklusa kod različitih kategorija životinja. Tako u zapačima tovnje junadi najveća primena antibiotika je u cilju kontrole respiratornog sindroma. U ovim uslovima, a posebno kad su u pitanju veliki zapači antibiotici se mogu aplikovati peroralno i to kroz vodu za piće što ima brojne prednosti (4). Pored toga, na tržištu postoji veliki broj preparata koji se mogu primeniti u terapiji pneumonija goveda (5). Ovo pruža široke mogućnosti u izboru terapije. Međutim, potrebno je imati na umu da terapija treba što manje da stresira životinje. Iz tog razloga



lek treba primeniti peroralno kad god je moguće ili ukoliko to nije opcija koristiti preparate sa produženim dejstvom koji se ne moraju primeniti svakodnevno, odnosno često je dovoljna jedna aplikacija.

U zapažanjima muznih krava najveća potreba za primenom antibiotika je u cilju kontrole i terapije mastitisa (2,6). Bez obzira na različite pristupe u različitim uslovima proizvodnje kontrola mastitisa predviđa rad na prevenciji, dok u slučaju pojave mastitisa terapiju kliničkih mastitisa u fazi laktacije a subkliničkih u fazi zasušenja (2,7). Ovo su opšte smernice i izbor adekvatne terapije zavisi od svakog konkretnog slučaja. Potrebno je uzeti u obzir ozbiljnost oboljenja, lokalne promene i promene opšteg stanja, izgleda na uspeh terapije, trošak terapije i karencu za mleko i meso (8).

Antimikrobna terapija je ključna komponenta u kontroli mastitisa u sistemu proizvodnje mleka i najčešće se koriste sledeće grupe lekova: penicilini, sulfonamidi, hinoloni i aminoglikozidni antibiotici. Pored antimikrobne terapije tretman mastitisa može da uključuje i druge farmakološke grupe lekova kao što su nesteroidni antiinflamatorni lekovi korikosteroidi, vitamini, citokini, vakcine (3). Efikasnost svake, a pogotovo trenutne i buduće terapije mastitisa zavisi od pravilne upotrebe antibiotika. Međutim, kao ozbiljan zdravstveni problem kom se posvećuje pažnja u poslednje vreme se ističe rezistencija bakterija na antibiotike. Naime, utvrđeno je da neodgovarajuća i neracionalna upotreba antibiotika utiče na pojavu antimikrobne rezistencije (AMR) (9), te da pojava AMR bakterijskih patogena predstavlja pretnju za populacije životinja i ljudi, sa potencijalnim rizikom prenosa AMR sa stoke u životnu sredinu i u lanac ishrane (10,11). Usled širenja AMR i značaja za očuvanje globalnog javnog zdravlja u okviru mnogih regulatornih tela širom Evrope i sveta postoje utvrđeni sistemi praćenja potrošnje antimikrobnih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini sa akcentom na praćenje pojave i širenja AMR. Sistematično prikupljanje i analiza podataka o rezistenciji bakterija u većini evropskih zemalja (uglavnom EU zemlje) vrši se od 1999. godine kroz mrežu EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) kojom koordinira Evropski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC). Takođe, u borbi protiv AMR poslednjih deset godina intenzivno učestvuje Evropska agencija za lekove (European Medicines Agency - EMA) koja se bavi strategijama koje se odnose na odgovornu i bezbednu primenu antibiotika. U nadzor i kontrolu sprečavanja i širenja AMR širom EU je uključena i Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA). Pored praćenja potrošnje antibiotika, racionalna upotreba antibiotika je ključna za očuvanje njihove efikasnosti, jer smanjenje nepotrebne upotrebe antibiotika dovodi do smanjenja rezistencije bakterija. Time racionalna (mudra) upotreba antibiotika predstavlja imperativ u savremenoj govedarskoj proizvodnji. Naime, u cilju racionalizacije upotrebe antibiotika vodeće svetske organizacije, a pre svega Svetska zdravstvena organizacija (SZO) su pribegle implementaciji principa takozvane “mudre upotrebe antibiotika” koja je esencijalna kako bi se sačuvala efektivnost ove važne grupe lekova (11) kao upotreba koja povećava terapijsku efikasnost antibiotika, a smanjuje razvoj antimikrobne rezistencije (12,13).

Kodeks mudre upotrebe antibiotika kao relativno kompleksno pitanje podrazumeva da u procenu mora biti uključeno sledeće: koji antibiotik se sme upotrebiti, kada, kod koje dijagnoze, u kojoj dozi i koliko dugo će trajati terapija. Naime, kodeks mudre upotrebe antibiotika se može opisati i kao lista pitanja na koje veterinar tj. kliničar mora da odgovori pre nego što se odluči na primenu antibiotika. U sprovođenju ovog kodeksa trebalo bi da budu uključene i druge institucije, kao što su resorna ministarstva (poljoprivrede i zdravlja), fakulteti, naučni i specijalistički instituti, mikrobiološke laboratorije, bolnice, ambulante, klinike, kliničari kao pojedinci (direktno implementiraju definisana načela), ali i vlasnici koji moraju biti edukovani kako bi razumno dali pristanak na takav pristup i sami ga se pridržavali. Principi mudre upotrebe antibiotika su:

- Antibiotike propisuju i aplikuju samo veterinari (i lekari), što podrazumeva da samo od njih zavisi obim primene antibiotika i da od njih zavisi rešenje problema pojave i širenja rezistencije na antibiotike.
- Treba učini sve da do infekcije ne dodje, a što podrazumeva sprovođenje programa redovne kontrole (čišćenja od parazita, vakcinacija, način ishrane, mineralno-vitaminski dodaci, pravilna nega, higijena, itd.). Podrazumeva se da je prevencija u nastajanju infekcije najvažnija kritična tačka u smanjivanju upotrebe antibiotika.
- U idealnim uslovima, upotreba antimikrobnih lekova treba da je posledica postavljanja pouzdane dijagnoze bolesti i prisutnih patogena, iza čega treba da se odredi najdelotvorniji lek. Izbor

nadelotvornijeg leka podrazumeva i laboratorijsko određivanje antibiotske osetljivosti specifičnih patogena, kao i farmakokinetička i farmakodinamička svojstva leka. Naravno da to nije uvek moguće, odnosno veterinari su prinuđeni da započnu empirijsku terapiju i pre dobijanja mikrobioloških rezultata.

- Laboratorijski testovi treba da budu zasnovani na preporukama CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, SAD*) i EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) o standardnim laboratorijskim testovima koji se koriste za izvođenje antibiograma i utvrđivanje MIK vrednosti za ispitivane antibiotike i hemioterapeutike. Prilikom rutinskog ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike u antibiogramu se mogu upotrebiti maksimalno 8 do 9 antibiotika koje odabere mikrobiolog, a prema CLSI i EUCAST antibiogram ne treba da sadrži više od 6 diskova antibiotika. Ovo poslednje ide u prilog činjenici da i mikrobiolog treba dobro da poznaje farmakodinamske i farmakokinetičke osobine leka, uključujući i moguće načine aplikacije. Ako se desi da je uzročnik rezistentan na sve antibiotike u antibiogramu, neophodno je uraditi takozvani prošireni antibiogram. Poznato je da u slučaju rezistencije uzročnika na sve antibiotike koji su registrovani za upotrebu u veterinarskoj medicini, veterinar ima zakonsko pravo da upotrebi lekove iz humane prakse. Zato je 2013. godine EU usvojila pravilo po kome svi antibiotici iz humane palete mogu upotrebljeni za lečenje životinja, a ovo pravilo je usvojeno i u Republici Srbiji. Naime, na veterinarski recept vlasnik može u humanim apotekama kupiti antibiotik koji je namenjen za lečenje ljudi.
- Antibiotike treba primenjivati samo za one životinjske vrste za koje je antibiotik registrovan, u tačno definisanim dozama i načinom aplikacije. Tačnije, treba izbegavati tkz. *Extra label* primenu antibiotika, odnosno primenu antibiotika koja odstupa od uputstva proizvođača. Ipak, treba biti obazriv posebno ako se ima u vidu da kod ranije registrovanih lekova nije izvršena revizija uputstva, pa veterinari mogu da naprave ozbiljnu stručnu grešku ukoliko postupe po uputstvu koje je zastarelo.
- Ako je antibiotik već indikovao, treba kad god je to moguće da se primeni neki od antibiotika uskog antimikrobnog spektra dejstva, koji ima selektivno dejstvo na izazivače bolesti. Takav antibiotik neće da prouzrokuje ili će samo delimično da dovede do poremećaja mikroflore kod domaćina. Da bi se dobio pozitivan odgovor, neophodno je sačekati rezultate antibiograma, a svakako da u slučaju težih infekcija veterinar treba da započne terapiju uz primenu antibiotika širokog spektra dejstva.
- Kombinacije antibiotika treba koristiti samo u slučajevima kada se kombinacijom pojačava antibakterijsko dejstvo (sepsa i druga teža stanja bolesti). Kada stignu rezultati antibiograma, veterinar bi trebalo da isključi jedan od antibiotika, ako se ispostavi da je njegova primena nepotrebna.
- Antibiotike treba izdavati samo na recept. Treba voditi statistiku o svakoj primeni antibiotika (koliko dana, koje doze, ishod lečenja, itd.), ali i pratiti novije naučne informacije o dozama i načinu aplikacije antibiotika ili hemioterapeutika, indikacijama za njihovu primenu i načinima lečenja (5,13).

Međutim, u terapiji mastitisa krava, antibiotici su često neophodni u cilju postizanja etiološkog izlečenja (3). Treba, ipak imati na umu da nije svaka aplikacija antibiotika doprinos terapiji te da neadekvatna primena ili predoziranje može imati i štetne posledice. Te posledice se ogledaju kroz direktno oštećenje parenhima vimena dejstvom aktivnih supstanci iz preparata i ovo može imati za posledicu povišen broj somatskih ćelija u mleku i nakon izlečenja (2). Način aplikacije leka može uticati na trajanje karence, lekovi namenjeni za intramuskularnu aplikaciju se često aplikuju intramamarno što može dovesti do dužeg prisustva rezidua u mleku. Povećanje rezistencije mikroorganizama je takođe posledica neadekvatne terapije. Zbog ovoga antibiotike treba primenjivati prema uputstvu, ispoštovati način aplikacije i dozu leka. Poželjno je terapiju odrediti na osnovu antibiograma mada kod kliničkih mastitisa zbog akutnog stanja nema dovoljno vremena te se lek odabira empirijski (5). U cilju manjeg utroška leka i postizanja terapijske koncentracije u optimalnom roku poželjno je birati intramamarni način aplikacije. Ovo je moguće kada mastitis ne prati poremećaj opšteg stanja životinje.

U slučajevima kada dolazi do promene opšteg stanja životinje pre svega apatije i prestanka apetita neophodno je primeniti sistemsku terapiju (4). U slučaju da se želi brzo postići efekat najbolji pristup je intravenska aplikacija hemoterapeutika. Postoji veliki broj različitih tipova antibakterijskih lekova različitih hemijskih struktura. Hemoterapeutici koji se najčešće koriste su: beta-laktamski, aminoglikozidi, linkosamini, tetraciklini, makrolidi, polipeptidi i kombinacije trimetoprima i sulfonamida. U novije vreme, klinička ispitivanja se izvode sa inhibitorima DNK giraze (fluorohinolonomi) u smislu njihove podobnosti

za upotrebu u terapiji mastitisa. Poznato je da se fluorovani hinoloni aplikovani parenteralno, naročito norfoksacin postižu visoku koncentraciju u mleku (više od 10 puta nego u serumu) i ova prednost može se koristiti za parenteralnu terapiju akutnog mastitisa. Za uspeh parenteralne terapije mastitisa sledeći faktori imaju veliki uticaj. Prvo stepen prokrvljenosti tkiva vimena, kod akutnog mastitisa je veoma bitan (2). Kod hroničnih mastitisa starost i snaga slojeva tkiva u velikoj meri određuju uspeh terapije. Kada je zapaljenski proces ograničen na mlečnu žlezdu i nema promene opšteg stanja životinje povoljan efekat se može postići lokalnom primenom antibiotika. Lokalna primena ima brojne prednosti u odnosu na sistemsku primenu. Efekat leka se brže postiže, lek se aplikuje direktno na mesto gde se nalazi patološki proces. Izbegavaju se neželjeni efekti koji mogu se pojaviti kod sistemske aplikacije. Zbog upotrebe manje doze leka ovo je i finansijski povoljnije. Neki autori, za terapiju teških formi mastitisa preporučuju kombinaciju intramamarnu i sistemske terapije (4). Naime, tretman mastitisa uključuje upotrebu intramamarnih preparata koji su obično kombinacija više antibiotika i obično jednog kortikosteroida ili parenteralnih injekcija u čiji sastav obično ulazi jedan antibiotik. Intramamarni preparati za krave u toku perioda laktacije se koriste u tretmanu kliničkog i subkliničkog mastitisa. Najčešće su u obliku intramamarnih suspenzija i pasti i aplikuju se u mlečni kanal pomoću mast-injektora. Ipak, intramamarna primena ima određena ograničenja i to na prvom mestu prohodnost mlekovoda koja može biti sistirana zbog edema zida ili nakupljanja fibrina ili propalog epitela kanala. Zatim postojanje i jačina barijera od vezivnog tkiva u upaljenim oblastima. Pored odgovarajućeg antibiotika, neki preparati u terapiji mastitisa sadrže kortikosteroide da bi se smanjila inflamacija vimena. Sistemsku primenu antibiotika u kombinaciji sa intramamarnom primenom je pokazala najbolje rezultate. Izmužanje može da utiče na efikasnost ove terapije i dužinu izlučivanja antibiotika putem mleka. U pravilu kravu ne bi trebalo izmuzati najmanje šest časova nakon intramamarnu primenu antibiotika. Nakon isteka ovog perioda je poželjno izmuzati kravu i eliminisati sekret iz vimena. Mnogi vlasnici greškom izbegavaju izmužanje krava 24 sata nakon intramamarnu aplikacije antibiotika i time odlažu proces oporavka (2).

U sprečavanje nastanka, razvoja i širenja antimikrobne rezistencije treba da budu uključeni svi, od veterinara do vlasnika/odgajivača životinja. Time doktori veterinarske medicine imaju važnu ulogu u borbi protiv antimikrobne rezistencije, ne samo putem racionalnog propisivanja antibiotika, već i kroz promovisanje racionalne upotrebe antibiotika i povećanje nivoa znanja vlasnika/odgajivača životinja o ovoj temi. Iz tog razloga se i u globalnom akcionom planu Svetske zdravstvene organizacije (SZO) ističe važnost edukacije zdravstvenih o upotrebi antibiotika i antimikrobnoj rezistenciji (14). U saglasnosti sa ovim akcionim planom u Republici Srbiji je usvojena Uredba o Nacionalnom programu za kontrolu rezistencije bakterija na antibiotike za period 2019–2021. godine (15). Ovaj program određuje ciljeve, plan aktivnosti i postupke koji će se u Republici Srbiji sprovoditi kako bi se zaustavilo širenje antimikrobne rezistencije među ljudima i životinjama. Posebna pažnja se posvećuje sprečavanju razvoja i širenja antimikrobne rezistencije kod životinja koje su namenjene ishrani ljudi, te je u globalnom planu SZO (16,17) naglašeno da pored dodiplomskog i postdiplomskog obrazovanja, kontinuirana edukacija veterinara treba da bude implementirana na adekvatan način kako bi se osiguralo da preventivna medicina, mudra upotreba antibiotika i antimikrobna rezistencija zauzimaju značajno mesto u edukaciji sadašnjih i budućih veterinara.

### Zaključak

Racionalna primena antibiotika kod farmskih životinja je jedan od bitnih preduslova za postizanje održivosti i isplativosti proizvodnje. Neadekvatna primena povlači čitav niz neželjenih posledica za samu životinju, povećava antimikrobnu rezistenciju i povećava troškove terapije. Usled navedenih razloga, neophodno je aktivnosti u okviru veterinarske struke usmeriti ka racionalizaciji upotrebe antibiotika, odnosno smanjenju antimikrobne rezistencije uz primenu kampanja za racionalnu upotrebu antibiotika - kontinuirano informisanje i edukacija opšte javnosti o racionalnoj upotrebi antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini.

**Zahvalnost**

Istraživanje je sprovedeno uz podršku Fonda za nauku Republike Srbije, PROMIS, #6066966, InfoBomat/This research is supported by the Science Fund of the Republic of Serbia, PROMIS, Grant No #6066966, InfoBomat.

**Literatura**

1. Radaković D. *Ekonomska ocena investicija u proizvodnji kravljeg mleka. Novi sad, 2016*
2. Radinović M., Pajić M. *Izrada programa kontrole mastitisa na farmama. Zdravstvena zaštita i reprodukcija farmских životinja; Novi Sad; 2018.*
3. Radinović M., Davidov I., Kovačević Z., Stojanović D., Galfi A., Erdeljan M. *Osnovni principi terapije mastitisa krava. Veterinarski žurnal Republike Srpske ISSN: 2019, 1840-2887.*
4. Ruegg P. *Responsible Use of Antibiotics for Treatment of Clinical Mastitis. 2019.*
5. Stojanović, D., Kovačević, Z, Radinović, M., Žugić, G. *Osnovni principi racionalne upotrebe antibiotika kod preživara. Zbornik predavanja jednodnevnog seminara Zdravstvena zaštita i reprodukcija farmских životinja, 26. maj 2018., Novi Sad, ISBN 978-86-900417-0-1, 134-142.*
6. Radinović M., Davidov I., Kovačević Z., Galfi A., Pajić M., Erdeljan M. *Koli-mastitis-etiotogeneza, dijagnostika i terapija. Zbornik predavanja jednodnevnog seminara Zdravstvena zaštita i reprodukcija farmских životinja, 26. 2018., Novi Sad, str. 95-100. ISBN 978-86-900417-0-1*
7. Boboš S., Pajić M., Radinović M., Galfi A., Velebit B., Rašić Z., Plavšić M., *Therapy of staphylococcal mastitis in cows. Veterinary medicine – Ukraine. 98, 2004, 105-111.*
8. Erskine R. J., Wagner S., De Graves F. J. *Mastitis therapy and pharmacology. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 19 (1): 2003, 109–138.*
9. Aarestrup FM, Wegener HC & Collignon P. *Resistance of Bacteria of the Food Chain: Epidemiology and Control Strategies. Expert Rev, Anti Infect. Ther. 6, 2008, 733-750.*
10. Kramer T, Jansen LE, Lipman LJA, Smit LAM, Heederik JJD, Dorado-García A, *Farmers' knowledge and expectations of antimicrobial use and resistance are strongly related to usage in Dutch livestock sectors, Prev. Vet. Med. 147, 2017, 142-148.*
11. Hughes LA, Williams N, Clegg P, Callaby R, Nuttall T, Coyne K, et al. *Cross-sectional survey of antimicrobial prescribing patterns in UK small animal veterinary practice. Prev. Vet. Med. 2012; 104(3– 4):309–316. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.003> PMID: 22225772*
12. Ungemach FR, Müller-Bahr D and Abraham G. *Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. Inter. J. Med. Microbiol. 296: 33–38. 2006; <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01>.*
13. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. *Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health: a critical review of published data. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 53:28–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg483> PMID: 14657094*
14. WHO (World Health Organisation). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015. [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA68/A68\\_R7-en.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R7-en.pdf?ua=1) datum pristupa 25.08.2020.*
15. *Uredba o nacionalnom programu za kontrolu rezistencije bakterija na antibiotike, Službeni glasnik RS, br. 8/2019. [http://www.pravno-informacioni\\_sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/vlada/uredba/2019/8/7/reg](http://www.pravno-informacioni_sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/vlada/uredba/2019/8/7/reg) datum pristupa 25.08.2020*
16. *World Health Organization (WHO). WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Available from: WHO/CDS/CSR/APH/2000.4. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68931/WHO\\_CDS\\_CSR\\_APH\\_2000.4.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68931/WHO_CDS_CSR_APH_2000.4.pdf?sequence=1) datum pristupa 25.08.2020.*
17. Oliver S. P., Murinda S. E., Jayarao B. M. *Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. Foodborne Pathog. Dis. 8 (3): 2011, 337–355.*

## **UTICAJ FAKTORA SREDINE NA KVALITET VAZDUHA U OBJEKTIMA ZA SMEŠTAJ GOVEDA**

Mira Majkić\*, Nada Plavša, Branislava Belić, Ivana Lakić

*<sup>a</sup>Departman za veterinarsku medicinu-Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

*\*kontakt: [miramajkic@gmail.com](mailto:miramajkic@gmail.com)*

### **Sažetak**

Kvalitet vazduha u objektima za smeštaj goveda zavisi od stepena zaprašenosti, broja mikroorganizama i čestica aerosola. Aerosoli su sitne čvrste ili kapljice tečnosti koje su suspendovane u vazduhu ili gasu. Koncentracija bioaerosola u vazduhu zavisi od vrste životinja koje se uzgajau, tipa objekta, načina ishrane i mikroklimatskih uslova u objektu. Fizičke osobine vazduha predstavljaju ključne elemente od kojih zavisi opstanak mikroorganizama. Pored temperature vazduha, relativna vlažnost vazduha je dodatni faktor od koga zavisi broj mikroorganizama. Optimalna relativna vlažnost vazduha u objektu je preduslov za normalno funkcionisanje sliznice respiratornog trakta. Relativna vlažnost vazduha je posebno bitna za opstanak gljivica. Broj mikroorganizama u vazduhu zavisi i od životinjske kategorije koja se uzgaja. Najveći broj mikroorganizama se očekuje u svinjarskim objektima, a kada je reč o objektima za smeštaj goveda, najveća koncentracija se očekuje u objektima zatvorenog tipa. Adekvatana ventilacija u objektu predstavlja važnu ulogu u očuvanju dobrobiti životinja, jer sprečava prekomerno povećanje relativne vlažnosti vazduha i održava nivoe štetnih gasova i čestice prašine iz okoline pod kontrolom. Preporuka je da je tokom leta potrebno imati prosečnu ventilaciju od oko 1700 m<sup>3</sup>/ h po grlu dok je zimi preporuka da brzina ventilacije bude od oko 85 m<sup>3</sup>/ h po grlu. Broj bakterija i gljivica je promenljiv i u većini slučajeva je visok u objektima za smeštaj mlečnih goveda. Visok nivo higijene u objektu se smatra ključnim u cilju smanjenja broja mikroorganizama u vazduhu. U cilju smanjenja mikroorganizama u vazduhu, neophodno je poboljšati ventilacione sisteme u objektima za smeštaj mlečnih goveda.

Ključne reči: Kvalitet vazduha, objekti za smeštaj goveda, faktori spoljašnje sredine

### **Apstract**

The air quality in dairy farms depends on the amount of dust, the number of microorganisms and aerosol particles. Aerosols are tiny solid or liquid droplets that are suspended in air or gas. The concentration of bioaerosols in the air depends on the type of animals, the type of objects, the diet and the microclimatic conditions. The physical characteristics of air are the key elements on which the survival of microorganisms depends. In addition to air temperature, relative humidity is another factor which the number of microorganisms depends. Optimal relative humidity in the farm objects is a precondition for the normal functioning of the mucous membrane of the respiratory tract. Relative humidity is especially important for the survival of fungi. The number of microorganisms in the air also depends on the animal category. The largest number of microorganisms is expected in pig objects, and for cattle farms, the highest concentration is expected in tay stall farms. Adequate ventilation in the facility plays an important role in preserving animal welfare. It prevents excessive increases in relative humidity and keeps levels of harmful gases and dust particles from the environment under control. It is recommended that during the summer it is necessary to have an average ventilation of about 1700 m<sup>3</sup> / h per head, while in winter it is recommended that the ventilation speed be about 85 m<sup>3</sup> / h per head. The number of bacteria and fungi is variable and in most cases is high in dairy cattle housing. A high level of hygiene in the objects is important role in order to reduce the number of microorganisms in the air. In order to reduce

microorganisms in the air, it is necessary to improve the ventilation systems in the facilities for dairy cattle farms.

Key words: Air quality, dairy farms, enviromental factors

### Uvod

Mikroklimat kao deo okruženja, predstavlja bitan faktor koji utiče na zdravstveno stanje i produktivne osobine životinja. Kvalitet vazduha u objektima može uticati i na zdravstveno stanje osoblja koje je zaposleno na farmama, pa svako eventualno širenje bioaerosola predstavlja veliku opasnost po zagađenje životne sredine. Stepenn kontaminacije vazduha zavisi od vrste mikroorganizama, njihovog broja, stepena patogenosti, kao i od atmosferskih karakteristika medijuma u kome se nalaze (1)

Vazduh kao deo mikroklimata predstavlja važan faktor koji utiče na zdravstveno-produktivne osobine. Kvalitet vazduha u objektima za smeštaj muznih krava zavisi prvenstveno od stepena zapašenosti, broja mikroorganizama i čestica aerosola. Aerosoli su sitne čvrste ili kapljice tečnosti koje su suspendovane u vazduhu ili gasu (2). Čestice aerosola mogu da nose neorganske supstance poput metala i organske supstance (policiklični aromatični ugljovodoni) Mikroorganizmi se takođe mogu smatrati česticama aerosola, zbog malih dimenzija. Kada se u česticama aerosola nalaze virusi, bakterije ili gljivice onda se takvi aerosoli nazivaju bioaerosoli (3). Pojedina istraživanja su dokazala vezu između mikroorganizama, infekcije i ćelijskog odgovora na prisustvo PM<sub>2,5</sub> čestica u vazduhu. Mikroorganizmi mogu biti suspendovani zajedno sa PM<sub>2,5</sub> česticama i dovesti do lokalnog ćelijskog odgovora i inflamacije (4). Uzročnik tuberkuloze je u česticama vazduha suspendovan u veličini od 0.65–4.7 μm i može se prenositi na udaljenosti od 1,5-2 m sekretima i ekskretima. Bakterije poput *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema kod krava. Prisustvo kvasnih gljivica u vazduhu može kontaminirati mleko nakon muže i učiniti ga neupotrebljivim za javnu potrošnju (5,6,7).

### Faktori koji utiču na opstanak mikroorganizama

Ukupan broj mezofilnih bakterija predstavlja dobar kriterijum ocene kvaliteta higijene vazduha. Na ukupan broj mezofilnih bakterija utiče nekoliko faktora, kao što su ukupan broj životinja koj boravi u objektu, način uzgoja, tip poda, vrsta prostirke, kvalitet mikroklimata, koncentracija prašine, nivo ventilacije

U zavisnosti od načina i tipa proizvodne kategorije, čestice aerosola mogu da potiču iz različitih izvora, što rezultira vrlo heterogenim sastavom i morfologijom (8). Formiranje čestica aerosola, suspenzija u vazduhu i njihova eliminacija u spoljašnju sredinu zavise od vrste životinja, smeštaja, načina ishrane, i faktora spoljašnje sredine. Čestice aerosola koje potiču iz staja specifične su zbog svojih visokih organskih sadržaj (iznad 90%) (9). Takođe mogu da deluju kao nosioci drugih supstanci, poput mirisnih jedinjenja i gasova koji su proizvedeni kao produkti metaboličkih procesa. Izlaganjem životinja česticama aerosola koje su iznad preporučenih vrednosti mogu se prouzrokovati uginuća životinja, i ozbiljno oštetiti disajni organi ljudi koji rade na farmskim objektima (10).

Koncentracija bioaerosola u vazduhu zavisi od vrste životinja koje se uzgajaju, načina smeštaja tj. tipa objekta, načina ishrane i mikroklimatskih uslova u objektu. Fizičke osobine vazduha (temperatura i relativna vlažnost) predstavljaju ključne elemente od kojih zavisi opstanak mikroorganizama (11). Aktivnost mikroorganizama u vazduhu može biti smanjena ukoliko je vlačnost vazduha suviše niska, zato što preterano suv vazduh inhibira metaboličke i fiziološke aktivnosti mikroorganizama. Većina gram negativnih bakterija preživljava pri nižim vrednostima relativne vlažnosti, za razliku od gram pozitivnih mikroorganizama kojima prija veća relativna vlažnost (12). Osim direktnog uticaja na stepen preživljavanja, fizičke osobine vazduha uticaj pokazuju i na potencijalnu mogućnost prenošenja na druge lokacije odnosno na udaljenost na koju se mikroorganizmi mogu preneti (13,14)

Broj i vrsta mikroorganizama u vazduhu na farmama mlečnih goveda zavisi od lokacije i godišnjeg doba. Različiti mikroklimatski uslovi u svakom lokalitetu pogoduju rastu i razvoju određenih vrsta mikroorganizama, a s obzirom na to da su bakterije organizmi koji su pod uticajem faktora spoljašnje sredine, podložni su sezonskim promenama (15).

Pojedini istraživači uočili su razlike u koncentraciji mikroorganizama u okruženju, u zavisnosti od sezone ili uticaja temperature i relativne vlažnosti vazduha. (16, 17). Sanz i sar., (18) su došli do zaključka da sezona pokazuje uticaj na broj izolata (*Escherichia coli*) u vazduhu. Rezultati pokazuju da je broj izolata dva puta veći tokom leta u odnosu na broj izolata prisutan tokom zime. Popescu i sar., (19) pronašli su pozitivnu korelaciju između povećanja temperature i broja mezofilnih bakterija. Rezultati su pokazali da je najveći broj bakterija prisutan tokom leta i to u najtoplijem delu dana.

Rezultati istraživanja Islam i sar., 2019 (1) pokazuje da sezona pokazuje uticaj na broj mikroorganizama u vazduhu. Rezultati ogleđa pokazuju da je najveći broj bakterija registrovan tokom letnje sezone, a da je kritičan mesec bio jun. Izolovane bakterije su bile *Stpf. Aureus* i *E.Coli*, a najveća koncentracija ovih baterija izmerena je u avgustu. Faktori koji utiču na preživaljavanje pomenutih mikroorganizamaa su temperatura i relativna vlažnost vazduha. Sa smanjenjem temperature smanjuje se i broj mikroorganizama koji se mogu naći u vazduhu.

Pored temperature vazduha relativna vlažnost vazduha predstavlja dodatni faktor od koga zavisi broj mikroorganizama. Ksiong i sar., (27). je zaključio da je optimalna relativna vlažnost vazduha u objektu preduslov za normalno funkcionisanje sliznice respiratornog trakta. Relativna vlažnost vazduha posebno je bitna za opstanak gljivica.

Mlečna goveda slabo podnose visoku vlagu. Preporučene vrednosti relativne vlažnosti vazduha na farmama za uzgoj mlečnih goveda se kreće između 55% i 75% i 70% za objekte za smeštaj malih preživara. Međutim, ove vrednosti se preklapaju sa optimalnim vrednostima koje su neophodne za opstanak većine bakterija i gljivica 55% -75% (27).

Vilson i sar., su došli do zaključka da niska vlažnost vazduha negativno utiče na sastav mikroorganizama u okruženju, pa je održavanje optimalne vlažnosti neophodno kako bi se rizik od nakupljanja većeg broja mikroorganizama smanjio. Pored negativnog uticaja na broj mikroorganizama, povećana vlažnost stimuliše rast i razvoj gljivica (20). Razlog je taj što veća vlažnost pogoduje bržem raspadanju organskih materija, što predstavlja idealnu sredinu za ras i razvoj gljivica. (28).

Studija koju su uradili Matković i sar., (2007) (29) je imala jza cilj da ispita mikrobiološki sastav vazduha u objektima za smeštaj muznih krava. Životinje su držane prema standardnim normativima preporučenim za smeštaj muznih krava. Uzorkovanje je vršeno tri puta u toku dana: ujutro u 7:30h, u podne u 12:00h i uveče u 18:30h tokom jedne nedelje. Materijal za bakteriološku dijagnostiku zasejan je na Columbia agar, na 37 °C tokom 24h. Materijal za dijagnostiku gljivica inokulisan je na Sabouro agar 5 dana na 22 °C.

Rezultati su pokazali da su u nnajvećem procentu prisutne gram pozitivne bakterije iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus* (79%), dok su od gram negativnih bakterija dominantne bakterije iz roda *Proteus* i ostale enterobakterije roda *Alcaligenes*, *Moraxella* i *Pseudomonas*. Zastupljenost gram negativnih bakterija bila je znatno niža (0,2%), što se može objasniti rezistencijom bakterija na uslove okruženja, tačnije, njihova ćeliska struktura (fosfolipidna membrana) gubi termodinamičku stabilnost prilikom kontakta sa okruženjem u kome borave.

Ispitivanje koje su radili Hoeksma i sar., (2016) (30) je imalo za cilj da utvrdi prisustvo određenih vrsta bakterija prisutnih u vazduhu, pri različitim temperaturama i relativnoj vlažnosti vazduha. Rezultati su pokazali da visoka vlažnost vazdoha inaktivise vrste *E. coli*, posebno pri vlžnosti vazduha od 80%, dok je vrsta *E.mundtii* ostao rezistentan na visoke temperature u kombinaciji sa visokom relativnom vlažnošću. *M. synoviae* se inaktivisu na višim temperaturama i na vlažnosti vazduha od 40%..

Popescu i sar., (2011). (19) su zaključili da je u vazduhu u objektima za smeštaj životinja dominantna vrsta *Staphylococcus spp.* (60% u jutarnjim i večernjim časovima), na drugom mestu su vrsta *Streptococcus spp.* (25% u večernjim i 20 % u jutarnjim časovima), dok su najmanje prisutne gram negativne bakterije (5% u jutarnjim i večernjim časovima). Kada je u pitanju prisustvo gljivica, istraživači su zaključili da se sa povećanjem vlažnosti vazduha, poveća broj gljivica prisutnih u vazduhu.

Studija (Quintana i sar.,2020) (20) je pokazala da ukupan broj mikroorganizama u vazduhu zavisi i od životinjske kategorije koja se uzgaja. Najveći broj mikroorganizama se očekuje u svinjarskim objektima, a kada je reč o objektima za smeštaj goveda, najveća koncentracija se očekuje u objektima zatvorenog tipa. Istraživanja pokazuju da se veći broj mikroorganizama koji se mogu naći u vazduhu

očekuje u maju mesecu sa tendencijom povećanja tokom letnjih meseci. Rezultati su pokazali da je najveći broj aerosolnih partikula dijametra 0.3–0.5, 0.5–1.0, 1.0–2.0, 2.0–5.0, i 5.0–10.0  $\mu\text{m}$  bio tokom letnjih meseci odnosno tokom juna i jula meseca, a tokom septembra meseca se očekuje smanjenje broja mikroorganizama. Temperatura ambijenta pokazuje pozitivan uticaj na opstanak mikroorganizama i više temperature vazduha pogoduju rstu i razmnožavanju bakterija.

Najveća koncentracija tzv. *airborn bacteria* (*S.aureus*, *E.coli*) registrovan je tokom agusta meseca. Koncentracija navedenih bakterija u vazduhu je direktno povezana sa temperaturom vazduha u objektu. Sa povećanjem temperature vazduha povećava se i broj bakterija koji se može naći u vazduhu (Islam i sar., 2019) (1). Razlog za povećanje koncentracije na prvom mestu *S.aureus* može biti taj što je transmisija uzročnika veoma raznovrsna. Sa druge strane, relativno niže koncentracije *E.Coli* se mogu objasniti feko-oralim putem transmisije, i postizanjem najveće koncentracije u fecesu.

Bakterije u vazduhu obično su povezane sa česticama prašine iz vazduha u okruženju (aerosoli) a čestice aerosola deluju kao nosač za veliki broj mikroorganizama (21,22). Broj bakterija u vazduhu zavisi od stepena zaprašenosti, odnosno veličine aerosola. Veća masa čestica aerosola sadrži više bakterija. Otkriveno je da čestice aerosola prečnika većeg od 2,0  $\mu\text{m}$  vezuju veće količine bakterija (23,24). Masa aerosolnih čestica može uticati na količinu mikroorganizama koju vezuju za sebe. Veće čestice aerosola su veće aerodinamičke veličine i mase i mogu vezati veću količinu bakterija. Linearni odnosi između koncentracije bakterija u vazduhu i masene koncentracije čestica aerosola variraju i na njih može uticati nekoliko faktora (temperatura vazduha, relativna vlažnost i izvori aerosolnih čestica) (21). Smatra se da je temperatura u objektu najvažniji faktor koji utiče na broj čestica aerosola. Na višim temperaturama postoji veća suspenzija dispergovanih čestica aerosola koji potiču iz stajnjaka, hrane, i okruženja. Takođe je dokazano da temperature imaju značajnu, pozitivnu korelaciju sa koncentracijom bioloških aerosola, a u objektima za smeštaj živine, a relativna vlažnost vazduha se pokazala kao bitan faktor (25,26).

Glavni cilj adekvatne ventilacije u objektima za smeštaj životinja je održavanje optimalnog kvaliteta vazduha. Neki patogeni iz okoline mogu biti pod kontrolom ukoliko je ventilacija rešena na adekvatan način. Iz tog razloga, pravilan režim ventilacije treba da obezbedi životinji potreban kiseonik, eliminiše štetne gasove, ukloni višak vodene pare, smanji temperaturu u objektu, ukloni prašinu i neprijatne mirise i smanji koncentraciju mikroorganizama. Važno je napomenuti da zadati ciljevi zavise od klime, doba godine, starosti životinja, i drugih faktora, kao što su tip objekta ili proizvodna kategorija koja se uzgaja. Orijentacija objekta je jedan od najuticajnijih faktora, uglavnom zbog većeg ili manjeg izlaganja vetru i sunčevoj radijaciji, koji utiču na izmenu vazduha između spoljašnjeg i unutrašnjeg dela objekta.

Na farmama gde se prvenstveno uzgajaju mlečna goveda najbolji sistem ventilacije je prirodna ventilacija, do koje dolazi zbog prirodnih pojava pritiska i razlike u temperaturi između različitih prostora unutar objekta. Međutim, u određenim slučajevima ventilacija može biti rešena mehaničkim sistemima (ventilatorima). Mehanički sistem ventilacije se koristi tamo gde se vazduh u objekat uvodi ili odvodi putem ventilatora sa fiksnim protokom. Međutim, ovakav način ventilacije nije najprikladniji kada su u pitanju farme mlečnih rasa goveda. Smatra se da stepen ventilacije i kvalitet razmene vazduha u objektima za smeštaj životinja su značajni faktori u cilju održanja zdravlja i zaštite od bolesti, jer će adekvatna ventilacija sprečiti nakupljanje prašine i patogena, u objektu. Na taj način se izbegava prenos prvenstveno respiratornih infekcija

Dokazano je da vetar i njegova brzina imaju veliki uticaj na opstanak mikroorganizama. Koncentracija štetnih čestica ponekad dostiže koncentracije veće od 104 ufc / m<sup>3</sup>. Sevi i sar. (31) preporučuju manje od 250 ufc / m<sup>3</sup>. Pored toga, ventilacija je od suštinske važnosti za održavanje zdravlja i proizvodnje mlečnih goveda. Adekvatna ventilacija u objektu predstavlja važnu ulogu u očuvanju dobrobiti životinja, jer sprečava prekomerno povećanje relativne vlažnosti vazduha i održava nivo štetnih gasova i čestice prašine iz okoline pod kontrolom. Preporuka je da je tokom leta potrebno imati prosečnu ventilaciju od oko 1700 m<sup>3</sup>/ h po grlu dok je zimi preporuka da brzina ventilacije bude od oko 85 m<sup>3</sup>/ h po grlu (32). Primećeno je da loša ventilacija rezultira povećanjem koncentracije štetnih gasova koji nastaju kao posledica respiratorne aktivnosti životinja i kao posledica povećane vlažnosti.



Visoka stopa ventilacije rezultira velikom koncentracijom prašine u vazduhu, verovatno zbog turbulentnog režima strujanja vazduha a koji održava čestice suspendovane u vazduhu duže vreme. Neadekvatni režim ventilacije pogoršava kvalitet mleka, primećen je veći broj somatskih ćelija i mezofilnih bakterija. Ukoliko se u objektima za smeštaj muznih krava ventilacija rešava upotrebom mehaničkih ventilatora, preporuka je koristiti brzinu ventilatora od 0,5 m / s. Porast stepena ventilacije između različitih područja farme se negativno odražava na koncentraciju mikroorganizama iz okoline. Iz tog razloga, lokacija ulaza i izlaza vazduha u oblastima u kojima se životinje odmaraju ima veliki uticaj na koncentraciju i širenje mikroorganizama.

Kao uzrok visokog nivoa zagađenosti vazduha, Lange i sar. (1997) (35) ukazali su na nepravilno funkcionisanje ventilacionih sistema, prisustvo veće količine vlage u hranivima i loši mikroklimatski uslovi. U studiji (Popescu i sar., 2011) broj mikroorganizama pronađenih u vazduhu bio je veći u objektima sa više od 50 krava, u zaprljanim objektima i objektima sa prostirkom. Loša ventilacija u većini pomenutih objekata je usko povezana visokom stepenu mikrobiološke kontaminacije vazduha. Povećana koncentracija mikroorganizama u vazduhu u objektima sa većim brojem životinja primećena je u nekoliko studija (Hinz i Linke, 1998; Predicala i sar., 2001)(36,37). Ekspirijumom se u okolinu izbacuju bakterije koje potiču iz gornjih partija disajnih puteva. Upotreba prostirke može biti potencijalni izvor bakterija, ali se sa aspekta dobrobiti upotreba prostirke smatra opravdanom. (Kim i sar., 2008) (38).

Gustina naseljenosti životinja je takođe važan parametar za procenu kvaliteta vazduha. Hartung (33) je dokazao da što je manja količina vazduha dostupna životinjama (tj. što je veća gustina naseljenosti u objektu), neophodno je ventilaciju dići na viši nivo.

Okruženje u kome životinja boravi, a posebno gustina naseljenosti u objektu su faktori od kojih u velikoj meri zavisi broj i sastav mikroorganizama. Kada se govori o gustini naseljenosti treba napomenuti da je ona u negativnoj korelaciji sa brojem mikroorganizama. Što je veća udaljenost između životinja u objektu, smanjuje se broj mikroorganizama i mogućnost aerogene transmisije. Smatra se da je broj mezofilnih bakterija u okruženju manji ukoliko je prosečna gustina naseljenosti od 5m<sup>2</sup> po životini (za goveda) i 2 m<sup>2</sup> po životinji (za ovce). Sledeći bitan faktor od koga zavisi broj i sastav mikroorganizama je vrsta prostirke koja se koristi. Ukoliko se kao prostirka koristi seno u objektu se može očekivati povećan broj propionskih bakterija i laktobacila, što se može negativno odraziti na kvalitet mleka. Monsallier i sar.,(34) su došli do zaključka da upotreba slame može povećati broj mikroorganizama u objektu. Takođe, je preporuka da se prostirka iz objekta uklanja svakodnevno kako bi se redukovao broj mikroorganizama koji potiču iz fecesa i urina. Tretiranje prostirke sa bentonito može smanjiti broj mikroorganizama. Bentonit je vulkanski materijal sastavljen uglavnom od minerala gline i ima veliku sposobnost apsorpcije vode. Adekvatna prostirka utiče i na dobar kvalitet mleka, i smatra se kritičnom tačkom u higijeni i proizvodnji mleka visokog kvaliteta.

Pojedine bakterije (*S.epidermis*, *S. xylosus*, *Stph. Scluri*, *S.aureus*) se mogu naći u okruženju u kome životinja boravi, a potencijalno su patogeni za ljude i životinje. *S. Epidermis* je deo normalne flore kože, sluzokože i kožnih žlezda, a kod ljudi može izazvati infekcije urinarnog trakta, endokarditis i septikemiju (Siqueira i sar., 2002) (39). *Stph. Simulans* je bakterija koja kod ovaca goveda i ovaca izaziva mastitis, a *Stph. Scluri* mogu biti široko rasprostranjene u prirodi a vode poreklo od domaćih životinja. Kod ljudi uglavnom izazivaju infekcije rana. *Stph. Aureus* je patogena bakterija ljudi i životinja a izaziva mastitise kod životinja, a kod ljudi izaziva gnojne infekcije i septikemije. Enterokoke su deo normalne crevne flore životinja, ali se mogu naći u većoj koncentraciji i u vazduhu.

Najčešće izolovane gljivice pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* *Cladosporium* Dominantne vrste blisko koreliraju sa registrovanim gljivičnim infekcijama. Najčešće aerosolne gljivice pripadaju rodu *Aspergillus* od kojih su neki oportunistički patogeni. Neke gljivice iz roda *Aspergillus* mogu proizvesti aflatoksine koji indukuju nastanak tumora ili smanjuju broj belih krvnih zrnaca.). Druga po učestalosti identifikovana vrsta pripada rodu *Penicillium*, a patogena je za ljude koji boluju od leukemije. Neke vrste mogu pokazati tropizam prema mozgu ili plućima, proizvodeći ohratoksine Treći rod po učestalosti bio je *Cladosporium*. Spore u vazduhu *Cladosporium* vrste su značajni alergeni i u velikim količinama mogu ozbiljno uticati na astmatičare i ljude sa respiratornim bolestima. Dugotrajno izlaganje može oslabiti imuni sistem. *Cladosporium* vrste ne proizvode mikotoksine, ali proizvode

isparljiva organska jedinjenja povezana sa mirisima. U uzorcima vazduha obično se identifikuju različiti kvasci. Kvasci mogu biti alergeni za pojedine osobe kada su prisutni u dovoljnoj koncentraciji (19).

### Zaključak

Istraživanja su pokazala da je broj bakterija i gljivica prilično promenljiv i da je u velikom broju slučajeva visok u objektima za smeštaj mlečnih goveda. Izolovana mikrobna flora sa patogenim potencijalom bila je zastupljena uglavnom sa gram-pozitivnim vrstama, od kojih se za neke navodi da imaju uslovno patogeni potencijal. Neke zabeležene gljivice se smatraju alergenim, toksičnim i patogenim za ljude i životinje. Visok nivo higijene u objektu se smatra ključnim u cilju smanjenja broja mikroorganizama u vazduhu. U cilju smanjenja mikroorganizama u vazduhu, neophodno je poboljšati ventilacione sisteme u objektima za smeštaj mlečnih goveda.

### Literatura

1. Islam, M., Ikeguchi, A., Naide, T. (2019). Concentrations of Aerosol Numbers and Airborne Bacteria, and Temperature and Relative Humidity, and Their Interrelationships in a Tie-Stall Dairy Barn. *Animals*, 9(12), 1023.
2. Zheng, L., Liu, S., Zhuang, G., Xu, J., Liu, Q., Zhang, X., Wang, Y. (2017). Signal transductions of BEAS-2B cells in response to carcinogenic PM<sub>2.5</sub> exposure based on a microfluidic system. *Analytical chemistry*, 89(10), 5413-5421.
3. Wei, J. Li, Y. (2016). Airborne spread of infectious agents in the indoor environment. *Am. J. Infect. Control*, 44, S102-S108.
4. Dong, H. Zheng, L. Duan, X. Zhao, W. Chen, J. Liu, X. Sui, G. (2019). Cytotoxicity analysis of ambient fine particle in BEAS-2B cells on an air-liquid interface (ALI) microfluidics system. *Sci. Total Environ.* 677, 108-119.
5. Fennelly, K.P. Martyny, J.W. Fulton, K.E. Orme, I.M. Cave, D.M. Heifets, L.B. (2004). Cough generated aerosols of *Mycobacterium tuberculosis*: A new method to study infectiousness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 604-609.
6. Xie, X. Li, Y. Chwang, A.T.Y. Ho, P.L. Seto, W.H. (2007). How far droplets can move in indoor environments—Revisiting the Wells evaporation-falling curve. *Indoor Air* 17, 211-225.
7. Wei, J. Li, Y. (2015). Enhanced spread of expiratory droplets by turbulence in a cough jet. *Build Environ.* 93, 86-96.
8. Cambra-López, M. Aarnink, A.J.A. Zhao, Y. Calvet, S. Torres, A.G. (2010). Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem. *Environ. Pollut.* 158, 1-17.
9. Takai, H. Pedersen, S. Johnsen, J.O. Metz, J.H.M. Groot Koerkamp, P.W.G. Uenk, G.H. Phillips, V.R. Holden, M.R. Sneath, R.W. Short, J.L. (1998). Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe. *J. Agric. Eng. Res.* 70, 59-77.
10. Cai, L.; Koziel, J.A.; Lo, Y.C.; Ho, S.J. (2006). Characterization of volatile organic compounds and odorants associated with swine barn particulate matter using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry olfactometry. *J. Chromatogr. A* 1102, 60-72.
11. Morawska, L. (2006). Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection? *Indoor Air* 16, 335-347.
12. Dungan, R.S. Board-Invited Review: (2010). Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* 88, 3693-3706.
13. Huneau-Salaun, A.; le Bouquin, S.; Bex-Capelle, V.; Huonnic, D.; Balaine, L.; Guillam, M.T.; Squizani, F.; Segala, C.; Michel, V. (2011). Endotoxin concentration in poultry houses for laying hens kept in cages or in alternative housing systems. *Br. Poult. Sci.* 52, 523-530.
14. David, B.; Moe, R.; Michel, V.; Lund, V.; Mejdell, C. (2015). Air quality in alternative housing systems may have an impact on laying hen welfare. Part I—Dust. *Animals* 5, 495-511.
15. Islam, M.A.; Ikeguchi, A.; Naide, T. Aerosols and bacteria concentration in different types of Japanese dairy milking houses. In *Proceedings of the 10th International Livestock Environment Symposium (ILES X)*, Omaha, NE, USA, 25-27 September 2018.

16. Naide, T.; Ikeguchi, A.; Islam, M.A.; Katusda, K.; Kawashima, K.; Nakakubo, R.; Miyazaki, A. Relationship between aerosol concentration and airborne microbe including porcine sapelovirus concentration in Japanese weaning swine houses. In *Proceedings of the 10th International Livestock Environment Symposium (ILES X)*, Omaha, NE, USA, 25–27 September 2018.
17. Cha, Y.; Tu, M.; Elmgren, M.; Silvergren, S.; Olofsson, U. (2019). Variation in airborne particulate levels at a newly opened underground railway station. *Aerosol Air Qual. Res.* 19, 737–748.
18. Sanz, S.; Olarte, C.; Martínez-Olarte, R.; Navajas-Benito, E.V.; Alonso, C.A.; Hidalgo-Sanz, S.; Somalo, S.; Torres, C. (2015). Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. *Int. J. Food Microbiol.* 197, 40–44.
19. Popescu, S.; Borda, C.; Diugan, E.A. (2011). Microbiological air quality in tie-stall dairy barns and some factors that influence it. *Afr. J. Agric. Res.* 6, 6726–6734.
20. Quintana, Á. R., Seseña, S., Garzón, A., & Arias, R. (2020). Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals*, 10(3), 526.
21. Tang, J.W. (2009). The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface*, 6, 737–746.
22. Pasanen, A.L.; Rautiala, S.; Kasanen, J.P.; Raunio, P.; Rantamäki, J.; Kallioikoski, P. (2000). The relationship between measured moisture conditions and fungal concentration in water-damaged building materials. *Indoor Air* 10, 111–120.
23. Wathes, C.M. (1994). Air and surface hygiene. In *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, pp. 123–148.
24. Verdier-Metz, I.; Michel, V.; Delbès, C.; Montel, M.C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26, 305–310.
25. Callejo, A. Alojamiento para vacas lecheras. In *Alojamientos e Instalaciones (II)*; Buxadé, C., Ed.; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 1998; pp. 115–159.
26. Bouton, Y.; Guyot, P.; Vacheyrou, M.; Normand, A.C.; Piarroux, R.; Beuvier, E. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. In *Proceedings of the 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques*, Rennes, France, 13–15 November 2007.
27. Xiong, Y.; Meng, Q.S.; Gao, J.; Tang, X.F.; Zhang (2017). H.F. Effects of relative humidity on animal health and welfare. *J. Integr. Agric.* 16, 1653–1658.
28. Adhikari, A.; Sen, M.M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. (2004). Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Int.* 29, 1071–1078.
29. Matković, K., Vučemilo, M., Vinković, B., Šeol, B., Pavičić, Ž. Matković, S. (2007). Qualitative structure of airborne bacteria and fungi in dairy barn and nearby environment. *Czech J. Anim. Sci.* 52(8), 249-254.
30. Hoeksma, P., Aarnink, A. J. A., Ogink, N. W. M. (2015). Effect of temperature and relative humidity on the survival of airborne bacteria Effect van temperatuur en relatieve luchtvochtigheid op de overleving van bacteriën in de lucht (No. 864). Wageningen UR Livestock Research.
31. Adhikari, A.; Sen, M.M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. (2004) , Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ. Int.* 29, 1071–1078.
32. Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Caroprese, M.; Marino, R.; Muscio, A. (2003), Ventilation effects on air quality and on the yield and quality of ewe milk in winter. *J. Dairy Sci.* 86, 3881–3890.
33. Hartung, J. (1994). Environment and animal health. In *Livestock Housing*; Wathes, C.M., Charles, D.R., Eds.; CAB International: Wallingford, UK,; pp. 25–48.
34. Monsallier, F.; Feutry, F.; Bouton, Y.; Convert, T.; Verdier-Metz, I.; Montel, M.C. (2014). Are bedding materials a source of useful microorganisms for dairy cow and ewe milk? In *Proceedings of the Joint Meeting FAO CIHEAM “Mountain Pastures, Mediterranean Forage Resources and Mountain Cheese” networks*, Clermont-Ferrand, France, 24 June
35. Lange JL, Thorne PS, Kullman GJ (1997). Determinants of culturable bioaerosol concentrations in dairy barns. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 4: 187-194.
36. Hinz T, Linke S (1998). A comprehensive experimental study of aerial pollutants in and emissions from livestock buildings. part 2: Results. *J. Agr. Eng. Res.*, 70: 119-129.
37. Predicala BZ, Maghirang RG, Jerez SB, Urban JE, Goodband RD (2001). Dust and bioaerosol concentrations in two swine – finishing buildings in Kansas. *Trans. ASAE*, 44(5): 1291-1298.
38. Kim KY, Ko HJ, Kim HT, Kim CN, Kim YS (2008). Assessment of airborne bacteria and fungi in pig buildings in Korea. *Biosyst. Eng.*, 99: 565-572.
39. Siqueira JF Jr, Lima KC (2002). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. *Aust. Endod. J.*, 28: 61-63.

## **ISCRPLJENOST TERMOREGULACIONOG SISTEMA KAO POSLEDICA HRONIČNOG TOPLOTNOG STRESA**

Zoran Ružić<sup>a\*</sup>, Zdenko Kanački<sup>a</sup>, Slobodan Stojanović<sup>a</sup>,  
Srđan Todorović<sup>a</sup>, Slavoljub Jović<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departman za veterinarsku medicinu – Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad

<sup>b</sup>Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bul. Oslobođenja 18, 11000 Beograd

### **SAŽETAK**

Toplotni stres (TS) u uzgoju tovnih pilića izaziva različite bihevioralne i fiziološke promene i prouzrokuje neočekivane ekonomske gubitke. U dostupnoj naučnoj literaturi nema dovoljno podataka o tome kako hronični TS deluje na sposobnost organizma da se izbori sa ovakvim ambijentalnim uslovima. Cilj ovog rada je da se ustanovi da li u uslovima prirodnog hroničnog TS može nastupiti iscrpljenost termoregulacionog mehanizma i smanjena sposobnost regulacije telesne temperature. U ogledu je korišćeno 80 pilića kroz 4 ponavljanja. TS je bio prisutan od 29. dana do kraja tova. 29., 30., 35. i 42. dana vršeno je merenje rektalne temperature u jutarnjim (PT) i večernjim časovima (KT), kao i izračunavan interval između njih. U našoj studiji primetan je trend porasta KT sa povećanjem starosti gde je 42. dana zabeležena najviša prosečna temperatura od 43,94 °C. 30. dana je zabeležen pad PT u odnosu na prethodni dan, dok je 35. i 42. dana bio prisutan porast. Može se zaključiti da u uslovima prirodnog hroničnog TS nastupa iscrpljenost termoregulacionog mehanizma, jer dolazi do smanjene sposobnosti regulacije telesne temperature.

Ključne reči: toplotni stres, tovnici pilići, rektalna temperatura, termoregulacioni sistem

### **ABSTRACT**

Heat stress (TS) causes various behavioral and physical changes in the breeding of broiler chickens and causes unforeseen economic losses. The available scientific literature does not offer enough information about the effects of chronic TS on the organism's capability to cope with this type of environmental conditions. The purpose of this paper is to determine whether the conditions of natural chronic TS can lead to the fatigue of the thermoregulatory mechanism and the reduced body temperature regulation capability. The experiment involved 80 chickens and 4 repetitions. TS was present from the 29<sup>th</sup> day up until the end of the breeding period. Rectal temperature was measured in the morning hours (PT) and the evening hours (KT) of the 29<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, and 42<sup>nd</sup> day, and the interval between them was calculated. The study has shown an increase in KT following the advancement of age, with the highest average temperature of 43.94°C observed on the 42<sup>nd</sup> day. On the 30<sup>th</sup> day, a decline in PT was observed in comparison with the previous day, while an increase was noticed on the 35<sup>th</sup> and 42<sup>nd</sup> day. It can be concluded that the fatigue of the thermoregulatory mechanism occurs in the conditions of natural chronic HS as a consequence of a reduced capability of body temperature regulation.

Key words: heat stress, broiler chickens, rectal temperature, thermoregulatory system

### **UVOD**

Termoneutralna zona je definisana kao temperaturna zona u kojoj ptice mogu da održavaju svoju telesnu temperaturu konstantnom uz pomoć fizičke regulacije toplote. Ova temperaturna zona zavisi od nivoa hranjenja, uslova stanovanja ptica i drugih faktora. Najniža temperatura u termoneutralnoj zoni, naziva se donja kritična temperatura. Ako temperatura padne ispod ove temperature, brojleri će početi da koriste energiju hrane za zagrevanje i posledično će trošiti više hrane. Najviša temperatura u

termoneutralnoj zoni naziva se gornja kritična temperatura. Ako temperatura poraste iznad ove temperature, ptice više ne mogu efikasno da odaju toplotu, odnosno nastaje toplotni stres (TS) (1). U uslovima TS pilići će da konzumiraju manje hrane i kao rezultat toga opadaće proizvodni rezultati. Toplotni stres u uzgoju tovnih pilića izaziva različite bihevioralne i fiziološke promene i prouzrokuje neočekivane ekonomske gubitke (2).

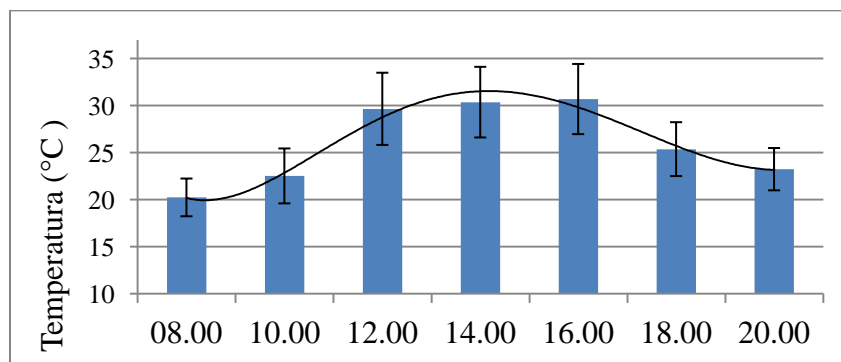
Različiti fiziološki parametri se mogu uzeti u razmatranje kao pokazatelji termalnog stanja u kome se nalazi životinja. Odnosno da li je životinja izložena TS i koliko je on intezivan. Jedan od najčešće korišćenih parametara, a ujedno i jedan od najjednostavnijih za određivanje, jeste merenje telesne temperature. Najčešće se telesna temperatura kod pilića meri rektalno i taj način se smatra standardom (3). Pored toga, telesna temperatura se može meriti i beskontaktnim načinima poput merača sa infra-crvenim zracima, termovizijskim kamerama (4, 5) i dr. Sredinom dvadesetog veka ustanovljeno je da je rektalna temperatura najpouzdaniji indikator inteziteta toplotnog stresa u kome se životinje nalaze (2).

U naučnoj literaturi postoji dosta tvrdnji za vrednosti idealne telesne temperature i uglavnom te vrednosti variraju između 41 i 42 °C kod pilića koji se nalaze u uslovima termoneutralnosti (3,6). U uslovima TS ove vrednosti u završnim danima tova mogu dostići temperaturu čak i do 46°C (7), pri čemu tovnji pilići uginjavaju. Povećanje telesne temperature usled TS objašnjeno je time da se u ovakvim slučajevima narušava ravnoteža između termogeneze i termolize (8). Kada je ova termalna ravnoteža narušena, pilićima je potrebno vreme da se vrate u odgovarajući balans, nakon što pilići dostignu najvišu vrednost (pik) telesne temperature. Istraživači Xing i sar. (2) navode da to vreme iznosi i do 18 časova nakon dostignuća pika temperature. U dostupnoj naučnoj literaturi nema dovoljno podataka o tome kako hronični TS deluje na sposobnost organizma da se izbori sa ovakvim ambijentalnim uslovima, naročito u završnim fazama uzgoja kada su pilići najosetljiviji.

Cilj ovog rada je da se ustanovi da li u uslovima prirodnog hroničnog TS (koji traje više dana) može nastupiti iscrpljenost termoregulacionog mehanizma i smanjena sposobnost regulacije telesne temperature.

## MATERIJAL I METODE

U ogledu je korišćeno 80 pilića teškog hibrida Cobb 500. Ogled je izvršen u 4 ponavljanja, pri čemu je bio jednak broj muških i ženskih jediniki. Tokom celog perioda tova praćeni su ambijentalni uslovi. Kako je ovo istraživanje sprovedeno u leto 2018. godine, očekivane su visoke temperature koje su i nastupile 29. dana tova i održale su se do kraja proizvodnog ciklusa. Leto 2018. godine je najtoplije leto prema minimalnoj temperaturi vazduha od kada se vrši merenje. Registrovano je čak 74 dana sa subjektivnim osećajem temperature preko 30 °C (9). Ambijentalna temperatura u objektu merena je od 08:00 do 20:00 u intervalima od 2h. U grafikonu 1 je dat prikaz prosečne temperature u objektu za period od 29. do 42. dana uzgoja. Ovakve temperature predstavljaju hroničan TS. RH se kretala u opsezima od 40-70%. Ostalim danima ambijentalni uslovi su bili u preporučenim vrednostima za ovaj hibrid pilića. Tokom celog perioda tova pilići su dobijali komercijalnu hranu za brojlere i vodu ad libitum.



Grafikon 1. Prosečne temperature u objektu od 29. do 42. dana uzgoja (°C)

29., 30., 35. i 42. dana vršeno je merenje telesne temperature kod 20 jedinki. Merenje telesne temperature je vršeno rektalno i vršeno je u jutarnjim časovima – početna temperatura (PT) i večernjim časovima – krajnja temperatura (KT). Od materijala je korišćen dvokanalni digitalni termometar GM1312 (Venetech, China) sa sondom tipa K, model SD0218-2 (Ootdy, China). Prilikom svakog merenja rektalne temperature, rađeno je i kontrolno merenje na drugom kanalu sa drugom sondom istog proizvođača, kako bi se prevenirale eventualne greške u merenju. Interval između PT i KT je preračunat i izražen kao  $\Delta T$ . Ova vrednost je izračunata za svako pile pojedinačno. Vrh metalnih sondi je bio obeležen na 3cm, kako bi se svim jedinkama jednako plasirala sonda, jer na različitim dubinama kloake mogu biti različite temperature. Hvatanje pilića i fiksacija je bila pažljiva, kako se pilići ne bi izlagali dodatnom stresu u toku ove procedure.

Vrednosti u radu su date kao srednja vrednost sa izraženom standardnom devijacijom, a statistička obrada je vršena primenom „R“ programskog jezika i programskog okruženja za statističke izračune (10). Utvrđivanje stepena statističke značajnosti razlika vršeno je metodom analize varijanse (ANOVA), dok je dalja analiza vršena primenom Dankanovog (Duncan) Post-Hoc testa za višestruka poređenja, za nivo značajnosti od 95% ( $p < 0,05$ ). Statistička značajnost utvrđena Dankanovim testom, u tabelama je iskazana različitim malim slovima u superskriptu.

## REZULTATI

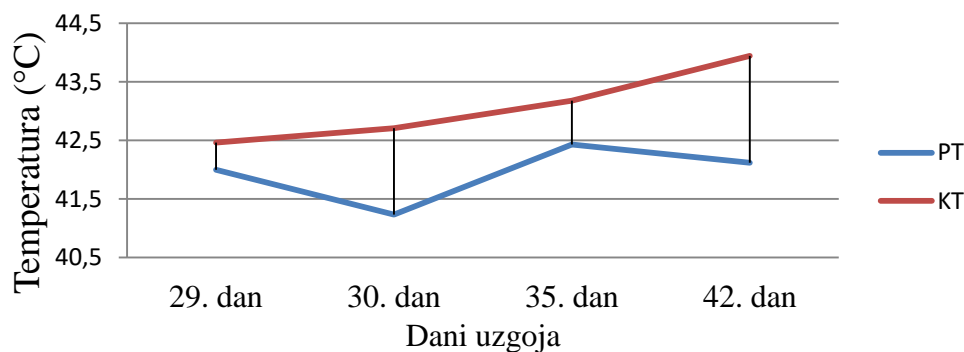
Tabela 1 prikazuje srednje vrednosti za jutarnju rektalnu temperaturu, kao početnu temperaturu (PT) i večernju rektalnu temperaturu kao krajnju temperaturu (KT), kao i za interval između ove dve vrednosti ( $\Delta T$ ) za dane uzgoja 29., 30., 35. i 42. dan tova. Ukoliko se posmatra PT (grafikon 2), može se zapaziti da su najveće vrednosti zabeležene 35. dana uzgoja, a najniže 30. dana uzgoja, sa postojanjem statistički značajne razlike. Za KT može se uočiti pravilnost da se sa povećanjem starosti povećava i telesna temperatura, što potvrđuje uočena statistička značajnost. Najmanji interval  $\Delta T$  (grafikon 2) možemo uočiti prvog dana kada je nastupio toplotni stres (29. dan), dok se najveći interval beleži poslednjeg dana tova (42. dan). Potrebno je napomenuti da se ovaj interval 30. dana tova utrostručuje nakon prethodnog dana. Takođe, za ovaj parametar uočena je statistički značajna razlika (tabela 1).

Tabela 1: Prikaz rektale temperature u ispitivanim danima ( $^{\circ}\text{C}$ )

	29. dan	30. dan	35. dan	42. dan
PT	$42,00 \pm 0,25^b$	$41,23 \pm 0,69^c$	$42,43 \pm 0,49^a$	$42,12 \pm 0,60^{ab}$
KT	$42,46 \pm 0,30^c$	$42,71 \pm 0,42^c$	$43,18 \pm 0,98^b$	$43,94 \pm 0,46^a$
$\Delta T$	$0,46 \pm 0,21^c$	$1,48 \pm 0,46^b$	$0,75 \pm 0,75^c$	$1,83 \pm 0,37^a$

Različita mala slova u redu prikazuju statističku značajnost  $P < 0,05$

Grafikon 2: Prikaz merenih temperatura i intervala između njih



Grafikon 2: Prikaz merenih temperatura i intervala između njih

**DISKUSIJA**

Jutarnja telesna temperatura (PT) 29. i 30. dana tova se kretala u fiziološkim vrednostima, ukoliko se te vrednosti poredi sa vrednostima autora Nascimento i sar. (3) i Elson (6) i, koji navode da je fiziološka temperatura u uslovima termoneutralnosti između 41 °C i 42 °C. 30. dana uzgoja primetan je pad rektalne temperature PT, sa statističkom značajnošću u poređenju sa prethodnim danom. Ovaj pad bi mogao da predstavlja jedan od odbrambenih mehanizama koji nastupa nakon prvog dana TS (29. dana), kako bi se novi dan i eventualni ponovni TS dočekao sa nižom telesnom temperaturom.

Već 35. dana uzgoja zapaža se porast u PT u odnosu na prethodne dane. Slični rezultati zapažaju se i 42. dana uzgoja. Vrednosti za ova dva dana mogla bi da sugerišu da postoji zamor termoregulacionog mehanizma i da jedinke „manje spremno“ dočekuju toplotni stres. Posledično zbog visokih početnih temperatura, očekivano je da će biti veća i KT.

Vrednosti KT su se kretale iznad granica fizioloških, što se može pripisati efektima TS. Do sličnih rezultata, gde TS dovodi do porasta telesne temperature dolaze i drugi autori (11,12). U našoj studiji primetan je trend porasta KT sa povećanjem starosti. Ovakvi rezultati sugerišu da slabi efikasnost održavanja telesne temperature sa povećanjem starosti. U prilog tome idu i rezultati istraživača Nascimento i sar. (13) koji primenom regresione analize dolaze do podataka da se proizvodnja metaboličke toplote povećava linearno ( $R^2=0,96$ ) sa povećanjem starosti od prvog do 42. dana uzgoja. U istoj studiji, najveća produkcija toplote je zabeležena 42. dana uzgoja, što se poklapa sa najvećom telesnom masom. Takođe je u istoj studiji zapaženo da je produkcija metaboličke toplote u korelaciji sa telesnom masom brojlera i da je zavisnost linearna ( $R^2=0,79$ ). Ovakva zapažanja idu i prilog tome da zbog intezivnog porasta tovnih pilića, u mnogome se ubrzava stopa metaboličkih procesa i shodno tome povećava se produkcija metaboličke toplote. Ovo povećanje produkcije toplote u završnim danima tova, mogla bi da dodatno oteža odavanje toplote koje je već narušeno usled efekata TS.

Autori Xing i sar. (2) i Sykes i Salih (14) smatraju da je interval između PT i KT ( $\Delta T$ ) dobar pokazatelj sposobnosti regulacije telesne temperature kod živine, kao i dobar parametar za selekciju u živinarstvu prema TS. Takođe ovi autori zapažaju da postoji negativna korelacija između  $\Delta T$  intervala i vremena preživljavanja u uslovima intezivnog TS. Rezultati našeg istraživanja mogli bi da sugerišu da manje vrednosti ovog intervala mogu da ukazuju na bolje podnošenje TS. Odnosno 29. dana može se uočiti najmanji interval  $\Delta T$ , a to je ujedno prvi dan TS, dan kada pilići mogu najadekvatnije da odgovore na ovakve uslove, što zbog svoje starosti, što zbog pripremljenosti termoregulacionog mehanizma. 30. dana, iako je postojala niža PT, indeks  $\Delta T$  je bio višestruko uvećan, što bi moglo da znači da iako tovnici pilići dočekuju TS sa nižom telesnom temperaturom, njihov termoregulacioni mehanizam je neadaptiran na višednevne ambijentalne uslove. 35. dana uzgoja, može se primetiti povećanje PT i smanjenje indeksa  $\Delta T$ . Smanjenje  $\Delta T$  indeksa moglo bi biti posledica neke vrste adaptacije, jer istraživači Xing i sar. (2) zapažaju da u uslovima neprekidnog TS, dolazi do blage adaptacije brojera nakon 54 časa od početka povećanja temperature, što bi moglo da se poredi sa našim rezultatima od 35 dana uzgoja. Drugo verovatnije objašnjenje bi moglo da bude da usled hroničnog TS koji je trajao 7 dana (od 29 dana), tovnici pilići nisu uspeli da se oporave od TS i da spuste dovoljno PT kako bi spremno dočekali novi dnevni TS. Ovo drugo objašnjenje je i verovatnije, jer u uslovima TS uvek je bolje da interval  $\Delta T$  bude mali sa niskim vrednostima PT. Ukoliko su male vrednosti intervala  $\Delta T$  sa izrazito visokim vrednostima PT, ovakve vrednosti ne moraju nužno da budu adekvatan i dobar odgovor termoregulacionog mehanizma. 42. dana uzgoja primetan je najveći interval  $\Delta T$ , što je praćeno najvećom KT i u ovom slučaju bi mogli da tvrdimo da visoke vrednosti  $\Delta T$  intervala upućuju na lošu adaptaciju i slabost termoregulacionog mehanizma da održe konstantnu telesnu temperaturu u uslovima višednevnog TS.

**ZALJUČAK**

Može se zaključiti da u uslovima prirodnog hroničnog TS (koji traje više dana) nastupa iscrpljenost termoregulacionog mehanizma, a takođe dolazi do smanjene sposobnosti regulacije telesne temperature. Ovi rezultati potkrepljeni su činjenicom da je KT imala trend porasta tokom dana kada je bio prisutan TS.

Takođe, interval  $\Delta T$  i PT mogu poslužiti kao jedan od pokazatelja termalnog stanja, ali je neophodno imati obe vrednosti u vidu radi njihovog adekvatnog tumačenja.

### ZAHVALNOST

Rad je finansiran sredstvima projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj TR31033.

### LITERATURA

1. <http://www.poultryhub.org/production/husbandry-management/housing-environment/climate-in-poultry-houses/> Datum pristupa: 30.08.2020.
2. Xing C., Pei W., Shen X., Zhao G., Run J. Rectal temperature as an indicator for heat tolerance in chickens. *Animal science journal* 2013, 84(11): 737-739.
3. Nascimento S., Silva I., Mourão G., Castro A. Bands of respiratory rate and cloacal temperature for different broiler chicken strains. *R Bras Zootec* 2012, 41(5):1318-1324.
4. Sellier N., Guettier E., Staub C. A review of methods to measure animal body temperature in precision farming. *American Journal of Agricultural Science and Technology* 2014, 2(2):74-99.
5. Bloch V., Barchilon N., Halachmi I., Druyan S. Automatic broiler temperature measuring by thermal camera. *Biosystems Engineering* 2019, dostupno online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537511019308062>
6. Elson H.A. Environmental factors and reproduction. In: Austic RE, Nesheim MC, editors. *Poultry production*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1995. p.389-409.
7. Silva M., Barbosa F., José A., Silva C., Rosário M., Silva I., Domingos C., Savino V. Avaliação do estresse térmico em condição simulada de transporte de frangos de corte. *R Bras Zootec* 2007, 36(4): 1126-3110.
8. Lin H., Buyse J., Du R., Gu X.H., Zhang Z.Y. Response of rectal temperature of broiler chickens to thermal environment factors. *Arch Geflugelkd* 2004, 68(3): 126-131.
9. RHMZ - Republički hidrometeorološki savez Srbije, 2018 - Sezonski bilten za Srbiju, leto 2018. <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/latin/2018.pdf>. Datum pristupa: 30.08.2020
10. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
11. Toplu O.H., Nazlıgül A., Karaarslan S., Kaya M., Yagin O. Effects of heat conditioning and dietary ascorbic acid supplementation on growth performance, carcass and meat quality characteristics in heat-stressed broilers. *Vet Fak Derg* 2014, 61(4): 295-302.
12. Abdelqader A., Al Fataftah A.R. Thermal acclimation of broiler birds by intermittent heat exposure. *J Therm Biol* 2013, 39(1): 1-5.
13. Nascimento S., Sandro A.M., Gebremedhin K.G., Nagib C. Metabolic heat production and evaporation of poultry. *Poultry Science* 2017, 96(8): 2691-2698.
14. Sykes A.H., Salih F.I. Effect of changes in dietary energy intake and environmental temperature on heat tolerance in the fowl. *British Poultry Science* 1986, 27: 687-693.



## **ISPITIVANJE REFERENTNIH VREDNOSTI KRVNIH PARAMETARA KOD PASA**

Ivana Lakić, Branislava Belić, Sandra Nikolić

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

*Autor za kontakt: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)*

### **Sažetak**

Referentni intervali su intervali izračunati iz grupe ili populacije zdravih odraslih životinja određene vrste za određeni parametar iz krvi i određenu vrstu testa. To su referentni intervali zasnovani na populaciji. Laboratorija za patološku fiziologiju je u periodu 2018-2019 godine uradila preko 20.000 analiza, poreklom od različitih životinjskih vrsta. Urađeno je preko 1200 uzoraka poreklom od pasa (zdravih jedinki, jedinki u preoperativnoj pripremi i jedinki koje su došle na dijagnostiku i terapiju). U ogled je uključeno 60 odraslih, zdravih pasa različitih rasa. Svaki od njih je primljen i pregledan na veterinarskoj klinici na Departmanu za veterinarsku medicinu – Poljoprivredni fakultet Novi Sad. Uzorci krvi su uzimani od svakog psa u dve epruvete (sa EDTA za hematološke analize i sa klot aktivatorom za biohemijske analize). Urađena je deskriptivna statistika za sve ispitivane parametre. Distribucije frekvencije i QQ plotovi za odstupanje od normalne distribucije su grafički predstavljani. Box-plot grafici koji pokazuju pozicione vrednosti kvartila i autlajere predstavljani su grafički. Referentni opsezi za ispitivane vrednosti se slažu sa referentnim opsezima koji postoje u svetski prihvaćenoj literaturi i preporukama laboratorija koje se bave kliničkom patologijom pasa. Veliki broj autlajera ukazuje na činjenicu da u okviru populacije mogu postojati i psi sa značajnim promenama u krvnim parametrima, ali se oni moraju tumačiti u odnosu na ono šta znamo o životinji, a ne samo na osnovu referentnih vrednosti koje je propisala laboratorija. U budućim istraživanjima potrebno je napraviti još veći obuhvat životinja, a referentne opsege treba posmatrati u funkciji rase, pola, starosti i drugih osobina životinja.

**Ključne reči:** psi, hematologija, biohemija, referentne vrednosti.

### **Abstract**

Reference intervals are intervals calculated from a group or population of healthy adult animals of a particular species for a specific parameter from the blood and a specific type of test. These are population-based reference intervals. The Pathological Physiology Laboratory has done over 20,000 analyzes in the period 2018-2019, originating from different animal species. More than 1200 samples were obtained from dogs (healthy individuals, preoperative individuals and those who came for diagnosis and therapy). The trial included 60 adult, healthy dogs of different breeds. Each of them was received and examined at a veterinary clinic at the Department of Veterinary Medicine - Faculty of Agriculture, Novi Sad. Blood samples were taken from each dog in two tubes (with EDTA for haematological analyzes and with a clot activator for biochemical analyzes). Descriptive statistics were compiled for all parameters tested. Frequency distributions plots and QQ plots for deviation from normal distribution were plotted. Box-plot showing position value of quartiles and outliers were plotted. The reference ranges for the values tested are consistent with the benchmarks that exist in the world-accepted literature and the recommendations of laboratories dealing with clinical pathology of dogs. A large number of outliers indicate that there may be dogs within the population with significant changes in blood parameters, but they must be interpreted in relation to what we know about the animal, not just based on benchmarks prescribed by the laboratory. In future research, greater coverage of animals should be made, and reference ranges should be considered in terms of race, sex, age, and other animal characteristics.

**Key words:** dog, hematology, biochemistry, reference value.

### Definicija i značaj referentnih vrednosti

Referentni intervali su intervali izračunati iz grupe ili populacije zdravih odraslih životinja određene vrste za određeni parametar iz krvi i određenu vrstu testa. To su referentni intervali zasnovani na populaciji. Ovi intervali se koriste kako bi se pomoglo identifikovanju abnormalnosti kod bolesnog pacijenta. U idealnom slučaju, svaka laboratorija treba da uspostavi referentne intervale, jer su zavisni od instrumentacije i reagensa. Iz tog razloga, referentni intervali mogu se znatno razlikovati od jedne do druge laboratorije. Kada dotične vrste nemaju referentni interval zasnovan na populaciji koji je laboratorija pružila rezultatima ispitivanja, moramo se osloniti na objavljene podatke, ako su dostupni za tu vrstu, kao vodič za tumačenje rezultata ispitivanja. Međutim, objavljene „normalne“ vrednosti možda nisu validne za rezultate koje je stvorila vaša laboratorija. Takođe biste trebali biti oprezni kada redovno tumačite promene u laboratorijskim podacima kod jednog pacijenta kada su podaci dobijeni iz različitih laboratorija. Pored toga, ne može se jednostavno primeniti interval drugog laboratorija na drugi instrument, npr. instrument nege u veterinarskoj klinici. Kao referentne intervale možete koristiti referentne intervale druge laboratorije, ali zato što različiti instrumenti i metode mogu dati prilično različite rezultate, trebali biste biti oprezni kada to radite. Referentne intervale treba utvrditi u svakoj laboratoriji i obično se određuju od a populacija zdravih odraslih životinja. Podaci bi trebali biti raspoređeni simetrično oko srednje vrijednosti (Gaussova distribucija). Referentni interval se izračunava kao srednja vrednost + 2 SD, što uključuje 95% normalnih uzoraka bez obzira na metodu. Nekoliko zdravih životinja (5%) imaće rezultate malo izvan referentnog intervala (bilo 2,5%). Za podatke koji nisu Gausovi, podaci se mogu matematički transformisati, npr. do logaritmi. Ako ovo dobije Gausovu distribuciju, geometrijska srednja  $\pm$  2 SD može se koristiti za određivanje referentnog intervala (geometrijska sredstva se temelje na podacima transformiranim u zapisima). Međutim, u većini slučajeva se neparametrijske statističke metode, tačnije percentili i kvartili, koriste za kreiranje referentnih intervala od ne-Gausovih podataka.

Ako je rezultat daleko izvan referentnog intervala, to verovatno ukazuje na postojanje neke bolesti, odnosno na neku grešku u radu. Kako znati kada je sigurno pretpostaviti da vrednost izvan referentnog intervala nije klinički relevantna? To će donekle zavisiti od analita, npr. blago povećanje jetrih enzima možda nije dijagnostički važno (zavisno od kliničkih znakova), međutim elektroliti se održavaju u prilično uskim granicama i promene su verovatnije da su klinički značajne (opet, u zavisnosti od kliničkih znakova i drugih nalaza - interpretirajte sa onim što znate o slučaju). Sledeći kriterijumi se mogu koristiti kao vodič pomoću kojeg možete sa sigurnošću pretpostaviti da visoki ili niski rezultat može biti patološki:

- Promena je blaga.
- Promena nije praćena drugim laboratorijskim rezultatima ili kliničkim znacima / pregledima ili nalazima slike koji bi bili povezani sa određenim patološkim procesom (npr. Vrlo blago povećanje aktivnosti ALT bez povećanja drugih rezultata ispitivanja jetre i bez bilo kakvih kliničkih znakova povezanih sa jetrom bolest), tj. nema dokaza o uzroku promene koji je povezan s bolešću.
- Promena nije povezana s bilo kojom poznatom patologijom
- Promena se može lako objasniti preanalitičkom promenljivom, npr. starost, pol, reproduktivni status, pasmina, lekovi.

### Referentne vrednosti krvnih parametara kod pasa u Laboratoriji za patološku fiziologiju – deskriptivna statistika, distribucija frekvencije, varijacija i autlajeri

Laboratorija za patološku fiziologiju je u periodu 2018-2019 godine uradila preko 20.000 analiza, poreklom od različitih životinjskih vrsta. Urađeno je preko 1200 uzoraka poreklom od pasa (zdravih jedinki, jedinki u preoperativnoj pripremi i jedinki koje su došle na dijagnostiku i terapiju). U ogled je uključeno 60 odraslih, zdravih pasa različitih rasa. Svaki od njih je primljen i pregledan na veterinarskoj klinici na Departmanu za veterinarsku medicinu – Poljoprivredni fakultet Novi Sad. Uzorci krvi su

uzimani od svakog psa u dve epruvete. Prva epruveta je sadržala EDTA kao antikoagulans (PUTH® vacuumne, K2EDTA), dok je druga sadržala klot aktivator (PUTH® vacuumne, Clot Activator).

Hematološka analiza- Iz prve epruvete je određena klasična krvna slika koja uključuje broj belih krvnih zrnaca (WBC) uz diferencijalnu leukocitarnu formulu (Ly- limfociti, Gr- granulociti, Monociti, Eo- eozinofili), crvenih krvnih zrnaca (RBC), hematokrit (HCT), koncentraciju hemoglobina (HGB), srednju zapreminu eritrocita (MCV), srednju koncentraciju hemoglobina po eritrocitu (MCH), srednju koncentraciju hemoglobina po litri krvi (MCHC) i broj trombocita (PLT). Analiza je urađena najkasnije u roku od jednog sata nakon uzorkovanja krvi. Korišten je biohemijski analizator koji radi na kombinovanom principu impedanse i lasera- Nihon Kohden Celltacα MEK-6550. Korišten je softver za hematološku analizu krvnih uzoraka pasa koji je ovlašteni operater instalirao na uređaj.

Nakon centrifugiranja, odvojen je serum i analiziran na spektrofotometrijskom automatskom biohemijskom analizatoru marke Rayto Chemray 120Vet. Reagensi korišteni pri svakoj analizi su pripadali proizvođaču Biosystems. Određeni su sledeći parametri: glukoza (Glu), kreatinin (Creat), urea, aspartat aminotransferaza (AST), alanil aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP), gama glutamil transferaza (GGT), albumin (Alb), ukupni proteini (TP), globulini (Glob), ukupni bilirubin (Tbil), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), fosfor (P), trigliceridi (TGC), lipaza, alfa amilaza. Endokrinološke analize rađene su na analizatoru TOSOH AIA-360.

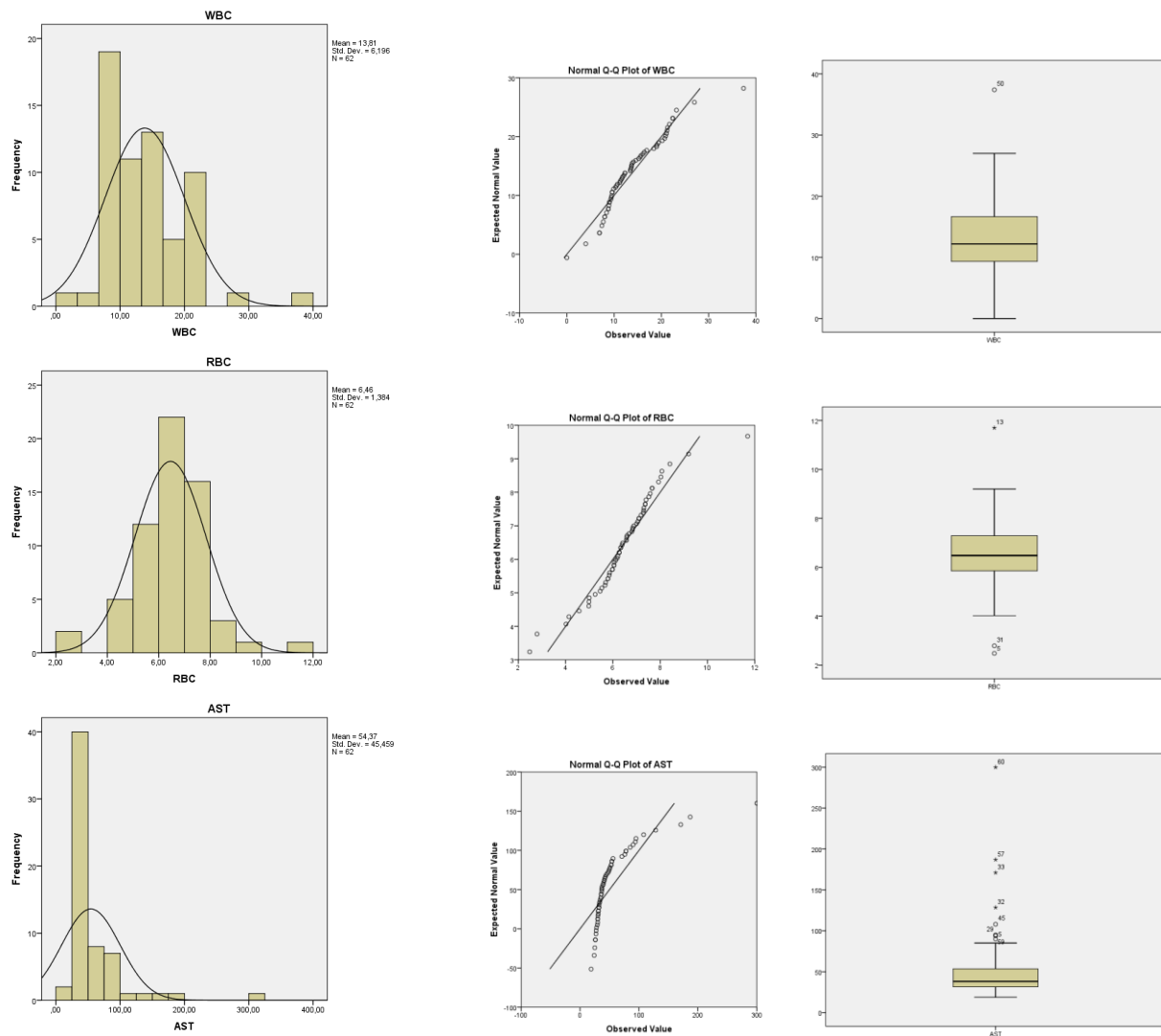
Statistika: Urađena je deskriptivna statistika za sve ispitivane parametre, grafičku su predstavljene distribucije frekvencije. Distribucije frekvencije i QQ plotovi za odstupanje od normalne distribucije su grafički predstavljani. Box-plot grafici koji pokazuju pozicione vrednosti kvartila i autlajere predstavljani su grafički.

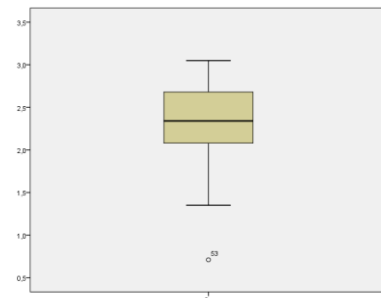
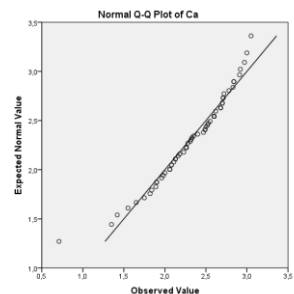
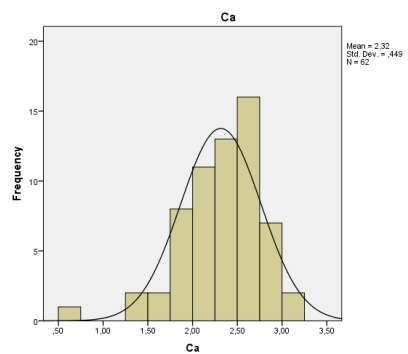
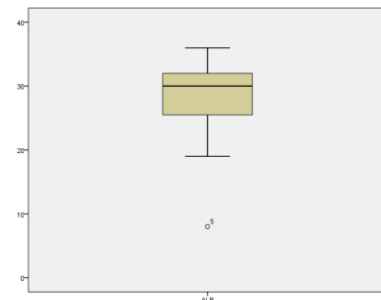
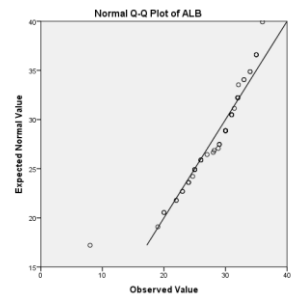
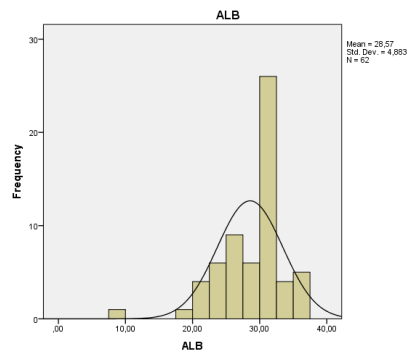
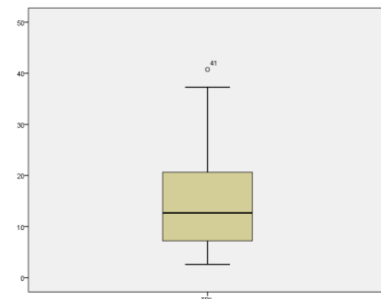
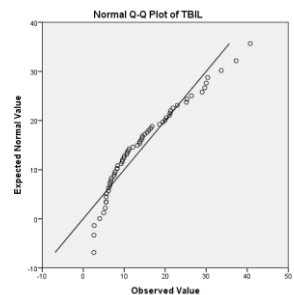
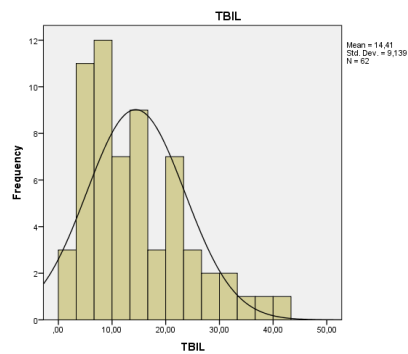
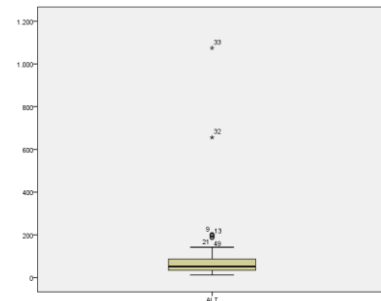
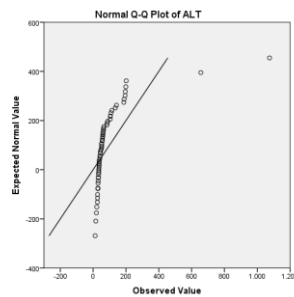
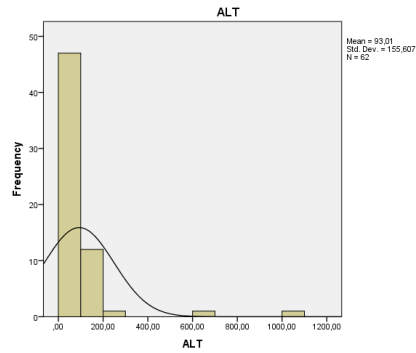
**Tabela 1:** Deskriptivna statistika za ispitivane krvne parametre kod pasa

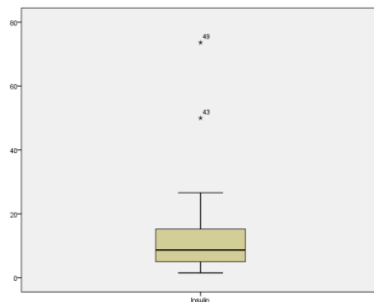
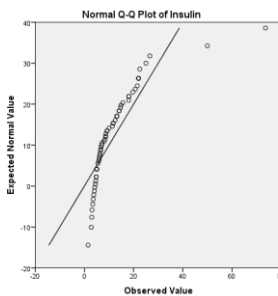
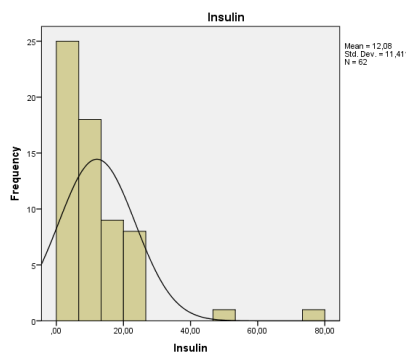
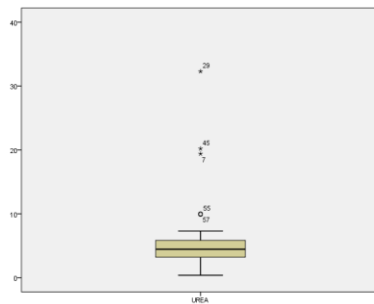
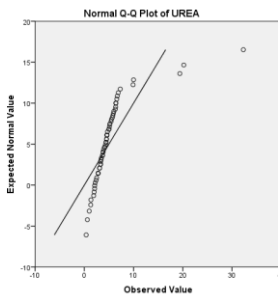
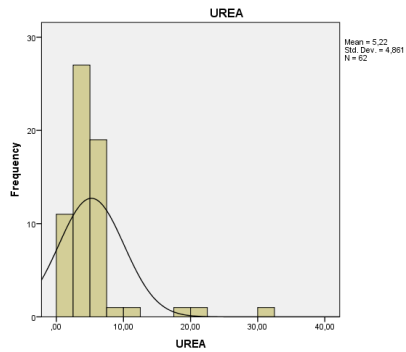
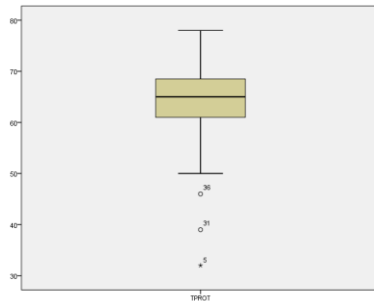
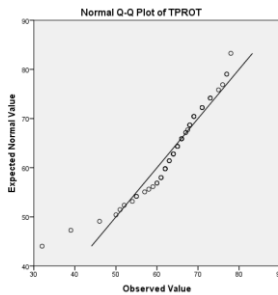
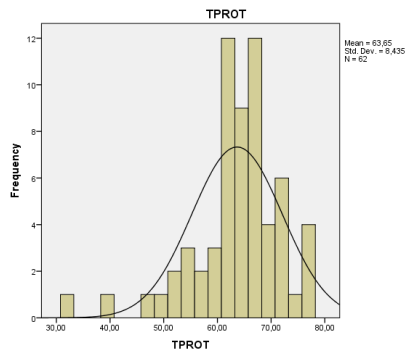
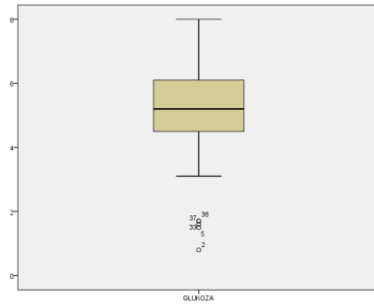
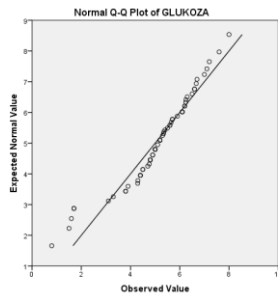
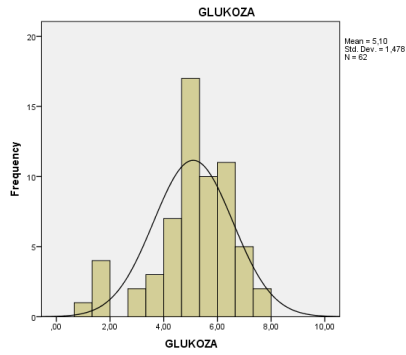
	Median	Std. Deviation	Skewness	Kurtosis	Percentiles	
					25	75
WBC	12,30	6,20	1,01	2,29	9,38	18,55
RBC	6,40	1,38	0,22	3,67	5,84	7,29
HGB	150,00	30,69	-0,11	3,21	138,75	166,50
HCT	43,50	9,32	0,22	3,54	39,10	48,10
MCV	67,60	2,97	-1,17	1,92	65,40	68,90
MCH	23,55	1,45	-0,71	0,21	22,40	24,53
MCHC	350,00	13,43	-0,52	-0,56	340,75	359,00
PLT	386,50	215,61	1,27	4,28	271,75	494,25
Ly	2,20	1,35	0,94	0,32	1,30	3,03
MO	0,40	0,53	4,42	24,41	0,30	0,50
Eo	0,30	0,67	4,33	22,96	0,10	0,40
Gr	9,45	18,58	3,02	8,60	6,70	17,60
Kreatinin	50,40	59,83	3,25	15,21	35,68	68,93
AST	38,13	45,46	3,44	14,61	31,00	54,00
ALT	51,67	155,61	5,06	28,67	33,75	92,75
TBIL	11,66	9,14	0,96	0,29	6,87	20,43
ALB	30,00	4,88	-1,44	3,85	25,00	32,00
P	1,55	0,82	1,90	10,87	1,16	1,78
Ca	2,33	0,45	-0,90	1,50	2,06	2,68
GLUKOZA	5,20	1,48	-0,92	1,24	4,48	6,13
GLOB	34,50	7,18	0,09	0,49	31,00	39,00
TPROT	64,50	8,43	-1,28	3,12	61,00	68,25
UREA	4,40	4,86	3,77	17,33	3,03	5,82
AMILAZA	636,67	450,55	1,97	3,90	468,50	821,33

Mg	0,73	0,32	0,35	0,32	0,53	0,99
TGC	0,80	0,76	3,35	12,94	0,57	1,00
LIPAZA	127,30	152,30	3,28	13,21	92,35	199,95
ALP	57,50	218,17	4,95	25,06	32,00	82,00
GGT	4,00	15,28	4,46	21,59	2,00	7,00
T4	22,90	11,17	0,76	-0,05	17,70	32,96
Kortizol	71,56	80,65	1,53	2,54	32,64	139,83
Insulin	8,60	11,41	3,28	14,57	5,00	15,08

Grafikoni: Distribucija frekvencije, QQ plot i outlajeri za hematološke parametre







## Zaključak

Referentni opsezi za ispitivane vrednosti se slažu sa referentnim opsezima koji postoje u svetski prihvaćenoj literaturi i preporukama laboratorija koje se bave kliničkom patologijom pasa. Veliki broj autlajera ukazuje na činjenicu da u okviru populacije mogu postojati i psi sa značajnim promenama u krvnim parametrima, ali se oni moraju tumačiti u odnosu na ono šta znamo o životinji, a ne samo na osnovu referentnih vrednosti koje je propisala laboratorija. Kod pasa u ovom istraživanju nije postojala klinička slika niti bilo kja poznata patologija. U budućim istraživanjima potrebno je napraviti još veći obuhvat životinja sa detaljnim anamnestičkim upitnikom, a referentne opsege treba posmatrati u funkciji rase, pola, starosti i drugih osobina životinja.

## Literatura

1. *Branislava Belić: Priručnik za polaganje ispita iz patološke fiziologije. Novi Sad, 2009, ISBN 978-86-7520-173-1*
2. *Marko R. Cincović: Toplotni stres krava. Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2010, ISBN 978-86-7244-911-2*
3. *Branislava Belić, Marko R. Cincović: Radna sveska sa priručnikom za polaganje ispita iz patološke fiziologije. Novi Sad, 2012, ISBN 978-86-7520-247-2*
4. *Branislava Belić, Marko R. Cincović: Praktikum iz patološke fiziologije. Udžbenik. Novi Sad, 2012, ISBN 978-86-7520-246-2*
5. *Radojica D. Đoković, Marko R. Cincović, Branislava M. Belić: Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom periodu. Udžbenik, Novi Sad, 2014, ISBN 978-86-7520-309-4*
6. *Branislava Belić, Marko R. Cincović: Patološka fiziologija. Udžbenik, Novi Sad, 2015, ISBN 978-86-7520-353-7*
7. *Marko R. Cincović: Metabolički stres krava. Monografija, Novi Sad, 2016, ISBN 978-86-7520-377-3.*
8. *Belić B.: Patofiziologija toksičnog dejstva hiperbaričnog kiseonika na membranu eritrocita, Monografija, Novi Sad, 2016, ISBN*
9. *Marko R. Cincović (ur.), Jože Starič (ur.), Branislava Belić, Jožica Ježek, Silvestra Kobal, Zorana Kovačević, Martina Klinkon, Marija Nemeč, Dragica Stojanović: Laboratorijska istraživanja metaboličkog statusa goveda/ Laboratorijske raziskave pesnovnega stanja goveda. Monografija, Novi Sad/Ljubljana 2017, ISBN 978-86-7520-440-4*
10. *Branislava Belić, Marko R. Cincović: Laboratorijske tehnike u patološkoj fiziologiji. Udžbenik, Novi Sad, 2019, ISBN 978-86-7520-474-9*
11. *Marko R. Cincović, Branislava Belić, Ivana Lakić: Praktikum iz laboratorijskih tehnika u patološkoj fiziologiji. Novi Sad, 2019, ISBN 978-86-7520-475-6.*

## **ETIOPATOGENEZA, DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KOD KUJA**

Sandra Nikolić, Branislava Belić, Ivana Davidov, Bojan Toholj, Ivana Lakić

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad  
Autor za kontakt: [neckovs021@gmail.com](mailto:neckovs021@gmail.com)*

### **Sažetak**

Etiopatogeneza tumora mlečne žlezde nije u potpunosti objašnjena, ali se smatra da sledeći faktori imaju značajan uticaj i predstavljaju faktore rizika u nastanku ovog oboljenja. Mamarne stem ćelije se tokom rasta i razvoja kuje diferenciraju u duktusne, alveolarne i mioepitelne ćelije, pod uticajem hormona. Prolongirano vreme diestrusne faze i izlaganje progestagenima se dovodi u vezu sa razvojem tumora mlečne žlezde pasa. Starosna dob je takođe jedan od veoma značajnih faktora rizika u nastanku tumora mlečne žlezde. Javlja se samo kod starijih pasa, incidencija je niska kod pasa starosti do 7 godina, dok se u starosti od 8 godina uočava nagli porast razvoja oboljenja, koji dalje raste sa starošću životinje. Razvoj tumora mlečne žlezde je doveden u vezu i sa gojaznošću. Prema WHO, tumori mlečne žlezde pasa su razvrstani u maligne, benigne, neklasifikovane tumore i hiperplaziju i displaziju mlečne žlezde. U literaturi su opisani sistemi za rangiranje tumora mlečne žlezde kod kuja na osnovu stadijuma tumora koji je prisutan, a najčešće se koriste sistemi po analogiji na humanu medicinu i tumore mlečne žlezde kod žena. Prvi sistem je klinički odnosno TNM sistem u kojem slovo T opisuje veličinu tumora, slovo N metastaze u limfne čvorove i slovo M udaljene metastaze. Drugi sistem je histološko određivanje stadijuma tumora kojim se procenjuje formiranje tubula u tumorskom tkivu, pleomorfizam jedra i broj mitozu u 10 polja posmatranih pod najvećim uveličanjem mikroskopa. Treći sistem koji može da se koristi u proceni stadijuma tumora jeste citološki. U slučaju tumora mlečne žlezde možemo razlikovati sledeće biomarkere: biomarkere proliferacije tumoroznih ćelija i apoptoze (Ki-67, PCNA, protein p53, E-cadherin, CEA, CA 15-3); biomarkere angiogeneze (VEGF, EGFR (HER1), HER-2); hormonske receptore; biomarkere inflamacije (Cox-2). Kliničke manifestacije tumora mlečne žlezde zavise od tipa tumora i momenta prijema pacijenta u odnosu na momenat pojave promene. Dalji tok dijagnostike vodi preko dijagnostičke citologije, snimanja (radiografija, kompjuterska tomografija, magnetna rezonanca) i na kraju patohistologije. Lečenje tumora je hirurško uz prateću medikamentoznu terapiju. Zbog svoje učestalosti i značaja rane dijagnostike potrebno je detaljno poznavati etiopatogenezu i terapijske procedure tumora mlečne žlezde kod kuja.

Ključne reči: kuja, tumor, mlečna žlezda, etiologij, biomarkeri, dijagnoza, terapija.

### **Abstract**

The etiopathogenesis of mammary gland tumors has not been fully explained, but the following factors are considered to have a significant impact and represent risk factors for the onset of this disease. Mammary stem cells differentiate into hormone-influenced ductus, alveolar and myoepithelial cells during growth and development of the bitch. Prolonged diestrus phase time and exposure to progestogens are related to the development of canine mammary tumors. Age is also one of the very significant risk factors for breast cancer. It occurs only in older dogs, the incidence is low in dogs up to 7 years old, while at the age of 8 years there is a sharp increase in the development of the disease, which further increases with the age of the animal. The development of mammary gland tumors has also been linked to obesity. According to WHO, canine mammary tumors are classified into malignant, benign, unclassified tumors and hyperplasia and dysplasia of the mammary gland. Literature has described systems for ranking mammary gland tumors in bitches based on the stage of the tumor present, and most commonly used systems by analogy to



human medicine and mammary gland tumors in women. The first system is a clinical or TNM system in which the letter T describes the size of the tumor, the letter N metastases to the lymph nodes, and the letter M distant metastases. The second system is the histological determination of the tumor stage, which assesses the formation of tubules in tumor tissue, nucleus pleomorphism and the number of mitoses in the 10 fields observed under the highest magnification of the microscope. A third system that can be used in the assessment of tumor stage is cytologic. In the case of mammary tumors, we can distinguish the following biomarkers: biomarkers of tumor cell proliferation and apoptosis (Ki-67, PCNA, protein p53, E-cadherin, CEA, CA 15-3); angiogenesis biomarkers (VEGF, EGFR (HER1), HER-2); hormone receptors; biomarkers of inflammation (Cox-2). The clinical manifestations of mammary gland tumors depend on the type of tumor and the moment of admission of the patient in relation to the moment of onset of the change. Further flow of diagnostics leads through diagnostic cytology, imaging (radiography, computed tomography, magnetic resonance imaging) and finally pathohistology. Tumor treatment is surgical with concomitant medication. Due to the frequency and importance of early diagnosis, it is necessary to know in detail the etiopathogenesis and therapeutic procedures of mammary gland tumors in bitches.

Key words: dog, tumors, mammary gland, etiology, biomarkers, diagnostics, therapy.

### **Etiopatogeneza tumora mlečne žlezde**

Etiopatogeneza tumora mlečne žlezde nije u potpunosti objašnjena, ali se smatra da sledeći faktori imaju značajan uticaj i predstavljaju faktore rizika u nastanku ovog oboljenja.

Mamarne stem ćelije se tokom rasta i razvoja kuje diferenciraju u duktusne, alveolarne i mioepitelne ćelije, pod uticajem hormona. Estrogen utiče na proliferaciju kanalića, dok progesteron utiče na razvoj alveola i mlečne žlezde životinje. Nakon sazrevanja, oslobađanje estrogena inicira razvoj žlezde, što se završava tokom i nakon trudnoće pod uticajem progesterona i prolaktina (*Sorenmo et al., 2011*). Aktivnost progesterona je najviša tokom graviditeta i diestrusne faze, što rezultira razvojem lobulusa i kanalića oivičenih višestrukim epitelnim omotačima. Prolongirano vreme diestrusne faze i izlaganje progestagenima se dovodi u vezu sa razvojem tumora mlečne žlezde pasa. Takođe, jedan od najvažnijih uzroka koji dovodi do tumora mlečne žlezde jeste rano izlaganje hormonima jajnika. Rizik od nastanka ovog oboljenja se povećava u zavisnosti od vremena sterilizacije jedinke, pa tako ženke, sterilisane pre prvog ovarijalnog ciklusa, imaju 0,5% rizik od razvoja tumora mlečne žlezde, dok one sterilisane nakon ovarijalnog ciklusa imaju rizik od 8%. Kod kuja sterilisanih u kasnijem uzrastu rizik raste na 26%. Osim ovoga, lažne trudnoće i upotreba progestina u kontroli ciklusa kuja mogu da doprinesu stvaranju tumora mlečne žlezde.

Imunohistohemijska istraživanja su utvrdila prisustvo estrogenih i progesteronskih receptora i kod benignih i kod malignih mamarnih tumora, što ukazuje na hormonski uzrok oboljenja. Različiti udeo estrogenih receptora je doveden u vezu sa povoljnom prognozom ishoda bolesti, a identifikovane su dve izoforme estrogenih receptora ER $\alpha$  i Er $\beta$ . Er $\beta$  pozitivni tumori su u većem broju slučajeva benigni nego maligni, a uopšteno ER pozitivni tumori su više diferencirani u odnosu na ER negativne tumore.

Starosna dob je takođe jedan od veoma značajnih faktora rizika u nastanku tumora mlečne žlezde. Javlja se samo kod starijih pasa, incidencija je niska kod pasa starosti do 7 godina, dok se u starosti od 8 godina uočava nagli porast razvoja oboljenja, koji dalje raste sa starošću životinje. U jednom istraživanju (*Sahabi et al., 2015*) prosek godina prilikom pojave tumora mlečne žlezde kuja je bio 8.66, dok u populaciji od 500 muških pasa nije zabeležen ni jedan slučaj oboljevanja. U drugoj studiji (*Sorenmo et al., 2011*) raspon od 8-11 godina je utvrđen kao starosna dob u kojoj se najčešće javljaju tumori mlečne žlezde kod kuja.

Od rasa za koje se smatra da poseduju genetsku predispoziciju ka tumorima mlečne žlezde u literaturi se navode minijaturne pudle, jazavičari, maltezeri, jorkširski terijeri, koker španijeli, nemački ovčari i mešanci.

Razvoj tumora mlečne žlezde je doveden u vezu i sa gojaznošću. Studije pokazuju da psi koji su gojazni u uzrastu od godinu dana ili ako su gojazni u godinu dana pre razvoja tumora imaju veću prevalencu nastanka tumora u odnosu na pse koji nisu gojazni (*Perez Alenza et al., 2000; Philibert et al.,*

2003). Isto istraživanje navodi da je razvoj i biološko ponašanje tumora mlečne žlezde kod pasa pod uticajem sadržaja telesne masti. Smanjen rizik od razvoja mamarnih tumora se dovodi u vezu sa lošom telesnom kondicijom u uzrastu od 9-12 meseci, dok u ovom istraživanju gojazne jedinke istog uzrasta nisu imale povećan rizik od nastanka tumora mlečne žlezde (Sorenmo et al., 2011).

### Tipovi tumora mlečne žlezde

Prema tkivu iz koga potiču tumori se dele na epitelne, mezenhimalne i mešovite. U sledećoj tabeli (Tabela 1.) dat je prikaz učestalosti pojave tumora razvrstanih po vrsti tkiva iz kojeg potiču i njihovom karakteru. Kao što se može primetiti iz tabele najčešći tumori mlečne žlezde kod kuja jesu mešovitog porekla. Prema WHO, tumori mlečne žlezde pasa su razvrstani u maligne, benigne, neklasifikovane tumore i hiperplaziju i displaziju mlečne žlezde. U sledećoj tabeli (Tabela 2.) dat je pregled tipova i podtipova tumora mlečne žlezde pasa prema WHO.

Tabela 1. Učestalost tumora prema vrsti tkiva i karakteru.

Tkivo porekla	CMT Benigni (%)	CMT Maligni (%)
Epitelni	30.4 ± 8.9	56.8 ± 9.7
Mezenhimalni	1.5 ± 1.5	6.9 ± 2.7
Mešoviti	68.0 ± 8.9	36.2 ± 9.1

Tabela 2. Tipovi i podtipovi tumora mlečne žlezde pasa (WHO).

Maligni tumori	Benigni tumori	Hiperplazije i displazije mlečne žlezde
1. In situ karcinomi	1. Adenomi Prost adenom Kompleksni adenom Bazaloidni adenom	1. Duktusna hiperplazija
2. Kompleksni karcinomi	2. Fibroadenomi Sa malim brojem ćelija Sa velikim brojem ćelija	2. Lobularna hiperplazija Epitelna hiperplazija Adenoza
3. Jednostavni karcinomi Tubulopapilarni karcinom Solidni karcinom Anaplastični karcinom	3. Benigni mešoviti tumori	3. Ciste
4. Specijalni tipovi karcinoma Karcinom vretenastih ćelija Karcinom skvamoznih ćelija Mucinozni karcinom Karcinom bogat mastima	4. Duktusni papilomi	4. Duktectazija
5. Sarkomi Fibrosarkomi Osteosarkomi Ostali sarkomi		5. Fokalna fibroza (fibroskleroza)
6. Karcinosarkomi		6. Ginekomastija
7. Komedokarcinomi		

### Stadijumi tumora mlečne žlezde

U literaturi su opisani sistemi za rangiranje tumora mlečne žlezde kod kuja na osnovu stadijuma tumora koji je prisutan, a najčešće se koriste sistemi po analogiji na humanu medicinu i tumore mlečne

žlezde kod žena. Prvi sistem je klinički odnosno TNM sistem u kojem slovo T opisuje veličinu tumora, slovo N metastaze u limfne čvorove i slovo M udaljene metastaze. Različite studije su pokazale jaku vezu između veličine tumora i maligniteta sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima i vremenom preživljavanja obolele životinje (*Ligia et al., 2016*). U sledećoj tabeli (Tabela 3.) opisani su klinički stadijumi tumora mlečne žlezde (*Owen, 1980*).

Tabela 3. Stadijumi tumora mlečne žlezde.

Stadijum	Veličina	Regionalne metastaze	Udaljene metastaze
Stadijum I	T1 — ≤ 3 cm	N0 — bez metastaze u limfne čvorove	M0 — odsustvo udaljenih metastaza
Stadijum II	T2 — 3 do 5 cm	N0 — bez metastaze u limfne čvorove	M0 — odsustvo udaljenih metastaza
Stadijum III	T3 — ≥ 5 cm	N0 — bez metastaze u limfne čvorove	M0 — odsustvo udaljenih metastaza
Stadijum IV	Bilo koja veličina	N1 — prisustvo metastaza u limfnom čvoru	M0 — odsustvo udaljenih metastaza
Stadijum V	Bilo koja veličina	N0 ili N1	M1 — prisustvo udaljenih metastaza

Drugi sistem je histološko određivanje stadijuma tumora kojim se procenjuje formiranje tubula u tumorskom tkivu, pleomorfizam jedra i broj mitozu u 10 polja posmatranih pod najvećim uveličanjem mikroskopa (*Goldschmidt et al., 2011*). Formiranje tubula se ocenjuje brojevima od 1 do 3 u zavisnosti od toga da li je procenat formiranja tubula u tkivu veći od 75% (1), od 10-75% (2) i manji od 10% (3). Jedarni pleomorfizam se takođe ocenjuje brojevima od 1 do 3 u zavisnosti od toga da li je veličina jedara uniformna (1), umereno varijabilne veličine i oblika (2) i naglašeno varijabilne veličine (3). Broj mitozu u 10 polja posmatranih pod najvećim uvećanjem se kao i u prethodnim slučajevima ocenjuje brojevima od 1 do 3, s tim da se od 0-9 ćelija u mitozu označava brojem 1, od 10-19 brojem 2 i više od 20 ćelija u mitozu brojem 3. Ako je ukupan skor tkiva 3-5, on se ocenjuje brojem 1 odnosno predstavlja promenu nižeg stadijuma. Ako je ukupan skor između 6 i 7, radi se o promeni srednjeg stadijuma i ona se označava brojem 2. Promena 3. stadijuma odnosno najvišeg stadijuma ima ukupni skor između 8 i 9. Tumori 3. stadijuma su povezani sa kratkim vremenom preživljavanja jedinke.

Ukupna ocena maligniteta (*Pena i Misdorp*): 3 – 5 I (nizak) dobro izdiferenciran tumor; 6 – 7 II (srednji) umereno diferenciran tumor; 8 - 9 III (visok) slabo diferenciran tumor.

Osim određivanja kliničkog i histološkog stadijuma tumora, najvažniji kriterijumi pri dijagnostici malignih tumora mlečne žlezde koje treba utvrditi jesu tip tumora, nuklearni i celularni pleomorfizam, mitotski indeks, prisustvo nekroza unutar neoplazme, invadiranje limfatičnog tkiva u okolini tumora i metastaze u regionalne limfne čvorove.

Treći sistem koji može da se koristi u proceni stadijuma tumora jeste citološki. Dijagnostička efikasnost citološkog ispitivanja razmaza tumorske mase i Robinsonovi citološki stadijumi tumora mlečne žlezde pasa predstavljeni su sledećom tabelom (Tabela 4.) Po ovoj klasifikaciji tumori I stadijuma imaju skor od 5-11, tumori II stadijuma 12-14, a tumori III stadijuma 15-18.

Tabela 4. Robinsonovi citološki stadijumi tumora mlečne žlezde pasa

Kriterijum	Skor		
	1	2	3
Raspodela ćelija	U klasterima	Mešavina pojedinačnih ćelija i klastera	Uglavnom pojedinačne ćelije
Veličina jedra	1-2 puta veće od eritrocita	3-4 puta veće od eritrocita	5 ili više puta veće od eritrocita
Uniformnost ćelija	Monomorfne ćelije	Blago pleomorfne ćelije	Pleomorfne ćelije
Nukleolusi	Neupečatljivi/mali	Primetni	Abnormalni/prominentni
Jedarne margine	Glatke	Blago nepravilne, užlebljene, savijene	Pupoljaste, rascepane
Hromatinski obrazac	Vezikularni	Granularni	Zgrudvan, rascepan

### Biomarkeri tumora mlečne žlezde

Biomarkeri su proteini koji se mogu izmeriti u krvi i tkivima i davati informaciju o prisustvu bolesti, rezultatima lečenja i prognozi. Svaki tip tumora ima specifične proteine koji se nazivaju tumorskim antigenima odnosno biomarkerima i koji se mogu detektovati u tkivima, serumu ili urinu u koncentracijama koje se razlikuju od fizioloških (*Kaszak et al.2018*).

U slučaju tumora mlečne žlezde možemo razlikovati sledeće biomarkere: biomarkere proliferacije tumoroznih ćelija i apoptoze (Ki-67, PCNA, protein p53, E-cadherin, CEA, CA 15-3); biomarkere angiogeneze (VEGF, EGFR (HER1), HER-2); hormonske receptore; biomarkere inflamacije (Cox-2).

Biomarkeri proliferacije tumoroznih ćelija i apoptoze – Procena proliferativnog potencijala tumora je veoma značajna u utvrđivanju maligniteta tumora. Visoko proliferativna aktivnost je povezana sa brzim tumorskim rastom i sposobnošću tumora da izazove udaljene metastaze. Ki-67 i PCNA predstavljaju biomarkere proliferacije, a p53 je biomarker neoplastične transformacije i apoptoze. Ki-67 je protein koji se nalazi u ćelijskom jedru samo tokom interfaze i tokom mitoze. Može se utvrditi i u citološkim uzorcima dobijenih biopsijom iglom iz tumora mlečne žlezde kuja. U humanoj medicini visoka ekspresija Ki-67 u tkivu tumora vezuje se uz nepovoljnu prognozu, a nasuprot tome, utvrđeno je da pacijenti sa visokim nivoima ovog biomarkera reaguju dobro na hemoterapiju, verovatno zbog visoke proliferativne aktivnosti (*Kaszak et al.2018*). PCNA je protein DNK polimeraze  $\delta$  koji je u ekspresiji u jedru ćelija tokom DNK sinteze ćelija u deobi. Takođe predstavlja biomarker indeksa proliferacije. Ekspresija PCNA dovedena je u pozitivnu korelaciju sa veličinom tumora, histološkim tipom tumora, stepenom diferencijacije, jedarnim osobinama, mitotskim indeksom, histološkim stepenom maligniteta i metastazom u limfne čvorove. Kao i Ki-67, njegova ekspresija je veća kod malignijih tumora, kod većih tumora sa ulceracijama po koži, histološkog stadijuma II ili III i prisustvom metastaza u limfne čvorove. Ipak, ekspresija PCNA ne mora biti specifična za tumor jer može biti stimulirana citokinima i stoga se preporučuje da se procenjuje u kombinaciji sa drugim biomarkerima, posebno sa Ki-67, jer je ekspresija ovog biomarkera prisutna samo tokom ćelijskog ciklusa (*Kaszak et al.2018*). Protein p53 je biomarker neoplastične transformacije i apoptoze. Odgovoran je za kontrolu ćelijskog ciklusa i apoptoze i supresor je razvoja tumora. Tokom neoplastičnih procesa, nagomilava se u tkivu tumora i usled mutacije gena, počinje da se ponaša kao onkogen. Mutacije p 53 gena se smatraju najčešćom genetskom alteracijom kod tumora dojki žena, a tako je i kod tumora mlečne žlezde kuja i u vezi su sa napretkom tumora. Njegova visoka ekspresija često nagoveštava male šanse preživljavanja. Sposobnost tumora da metastazira zavisi od adhezije ćelija jedne za druge kao i za okolna tkiva. Jačina tih veza se meri nivoima ekspresije proteina koji učestvuju u ovim procesima, a u adhezione molekule se najčešće ubrajaju integrini, slektini, imunoglobulinima slične čestice i kadherini. Kadherini su kalcijum-zavisni transmembranski proteini i dobri indikatori metastaze tumora. Kod tumora mlečne žlezde se najčešće procenjuje ekspresija E-kadherina (epitelnog kadherina) i njegova smanjena ekspresija je povezana sa razvojem tumora i

napretkom bolesti, malignitetom, agresivnošću metastaza i kratkim vremenom preživljavanja. CEA i CA 15-3 su takođe adhezivni glikoproteini utvrđeni kod kuja sa tumorima mlečne žlezde, gde CA 15-3 ispoljava pozitivnu korelaciju sa stadijumom tumora (više serumske koncentracije CA 15-3 se javljaju kod karcinoma II i III stadijuma u odnosu na karcinome I stadijuma). Ovaj adhezivni molekul se javlja u normalnom tkivu mlečne žlezde, kao i kod benignih tumora. Zbog toga, sve biomarkere ne treba tumačiti samostalno, već u kombinaciji sa drugim biomarkerima.

**Biomarkeri angiogeneze** – Kod svakog neoplastičnog procesa dolazi do formiranja novih krvnih sudova na bazi već postojećih krvnih sudova, što je neophodno za snabdevanje tumora hranljivim materijama. Kako tumor raste, napreduje i angiogeneza. Zbog toga su ovi biomarkeri važni za utvrđivanje rasta tumora i prisustva metastaza. Najčešći biomarkeri angiogeneze su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i von Willebrandov faktor VIII. VEGF stimuliše migraciju ćelija i proliferaciju endotela, povećava mikrovaskularnu permeabilnost, što omogućava ćelijama da prođu kroz krvne sudove i formiraju udaljene metastaze. Takođe, inhibira regresiju novoformiranih krvnih sudova, stimuliše stvaranje novih krvnih sudova i inhibira apoptozu. EGFR (HER 1) povećava angiogenezu i metastaze i povezan je sa lošim ishodom. Visoka ekspresija ovog biomarkera je u korelaciji sa veličinom tumora, nekrozom tumora, visokim mitotskim indeksom, histološkim stadijumom tumora i lošom kliničkom slikom. HER-2 reguliše rast tumora, diferencijaciju i stopu preživljavanja. Smatra se biomarkerom lošeg ishoda.

**Hormonski receptori** – Estrogen i progesteron su među najviše izučavanim biomarkerima tumora mlečne žlezde i smatra se da oba imaju ulogu u rastu tumora. Kod većine tumora mlečne žlezde postoji ekspresija ER i/ili PR. Studije su utvrdile da estrogen- negativni (ER-) i progesteron-pozitivni (PR+) tumori imaju lošiji ishod u odnosu na ER+ i PR+ tumore, dok ER- i PR- tumori imaju najnepovoljniju prognozu od svih.

**Biomarkeri inflamacije** – Kod svakog neoplastičnog procesa je prisutna hronična inflamacija. Inflamatorne ćelije sekretuju proinflamatorne medijatore, kao što su citokini i hemokini od kojih neki potpomažu angiogenezu i samim tim rast tumora. Cox-2 (ciklooksigenaza) se javlja kod tumora mlečne žlezde, ali nije specifična jer se nalazi i u svakom drugom tkivu u kom je prisutan proces inflamacije. Cox-2 inhibitori su korisni u lečenju tumora mlečne žlezde kuja u kombinaciji sa drugim antitumornim lekovima.

### **Kliničke manifestacije tumora mlečne žlezde**

Kliničke manifestacije tumora mlečne žlezde zavise od tipa tumora i momenta prijema pacijenta u odnosu na momenat pojave promene. Obično se vlasnici javljaju u veterinarsku ambulantu zbog prisustva manjih ili većih kvržica u nivou mlečne žlezde psa. Nije redak slučaj da životinja po prvi put stigne na pregled sa velikim, ulcerisanim tumorom koji je nekrotizovao, flisuje ili krvari. U tim slučajevima se od kliničkih simptoma mogu još uočiti i povišena telesna temperatura, anoreksija, mršavljenje, bolnost, promene u stavu, letargija, anemija ili sistemski znaci bolesti. Najčešće su tumorom kod kuja zahvaćene kaudalne abdominalne i ingvinalne mamarne žlezde (*Sahabi et al., 2015; Sorenmo et al., 2011*). Smatra se da je razlog ovome bogatije žlezdano tkivo, veća masa i duže vreme sekretorne aktivnosti abdominalnih i ingvinalnih žlezda (*Mitchell et al., 1974*). Može se javiti više tumora mlečne žlezde kod kuje, a takođe mogu biti i različitog porekla i maligniteta. Tumori mogu biti pričvršćeni ili mobilni, mali, veliki, sa ulceracijama po površini (*Mitchell et al., 1974; Sorenmo et al., 2011*).

Metastaze su česta pojava kod tumora mlečne žlezde kuja. Nastaju tako što ćelije primarnog tumora ulaze u cirkulaciju, invadiraju udaljena mesta i formiraju sekundarne tumore. Hematogeno metastaziranje u pluća predstavlja najčešći uzrok smrti kod kuja sa malignim tumorima mlečne žlezde (*Klopfleisch et al., 2011a; Rasotto et al., 2012*). Drugi način nastanka metastaza je preko limfnog sistema i limfnih čvorova, odakle se tumor širi na druga tkiva u telu (*Rasotto et al., 2012*). Iz ovih razloga se radi procene stadijuma tumora, obavezno vrši pregled pluća i regionalnih limfnih čvorova da bi se utvrdile abnormalnosti i mogući tragovi metastaza u druge organske sisteme. Najčešće lokacije metastaza tumora mlečne žlezde kuja date su u sledećoj tabeli (Tabela 4.)



Slika 1.i 2. Tumor ingvinalne mlečne žlezde psa (orig.foto S.Nikolić)

Tabela 5. Lokalizacija metastaza kod kuja sa tumorima mlečne žlezde

Organ/tkivo metastaze	Autori
Limfni čvorovi	Kim et al., 2011; Sorenmo et al., 2000
Pluća	Sorenmo et al., 2011
Jetra, bubreg i slezina	Kim et al., 2011; Valenčáková-Agyagosová i Ledecký, 2011
Mozak, oko, koža, kosti, srce	Kim et al., 2011; Valenčáková-Agyagosová i Ledecký, 2011

### Dijagnostička ispitivanja kod tumora mlečne žlezde

Proces postavljanja dijagnoze počinje detaljnom istorijom bolesti u kojoj su bitne informacije o uzrastu, rasi, parenju, upotrebi egzogenih hormona, podacima o povredama i vakcinaciji. Nakon ovoga sledi kvalitetan klinički pregled koji će se osim na očigledan tumor bazirati i na druge organske sisteme kako bi se isključilo prisustvo prikrivenih bolesti. Tokom pregleda samog tumora, treba obratiti pažnju na njegovu veličinu, lokalizaciju, broj zahvaćenih žlezda i mase okolnog tkiva, pokretljivost i prisustvo ulceracija. Regionalni limfni čvorovi treba takođe pažljivo da se ispitaju u smislu uvećanja koja su česta u slučajevima metastaza. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti hematome, apscese, ciste, granulome i hiperplaziju mlečne žlezde. Infekcije tumora mlečne žlezde su veoma česte zbog lizanja i ujeda u predelu tumorske mase i njene kontaminacije bakterijama iz zemljišta na kojem psi borave. Dalji tok dijagnostike vodi preko dijagnostičke citologije, snimanja (radiografija, kompjuterska tomografija, magnetna rezonanca) i na kraju patohistologije.

Dijagnostička citologija je veoma značajan metod u dijagnostici tumorskih oboljenja, a uzorci za pregled se dobijaju aspiracijom tankom iglom (fine needle aspiration FNA) iz tkiva tumora, a kod tumora koji su otvoreni i flisuju, može i otiskom ulceriranog mesta na predmetnu pločicu. FNA je jednostavna za izvođenje, ali nije baš najidealniji metod za klasifikaciju tumora, jer nedostaje tkivna arhitektura. Sa druge strane, FNA je veoma važna u početnoj fazi dijagnostike jer omogućava da se isključe diferencijalne dijagnoze kao što su mastitis, apscesi i hiperplazija (Cassali et al., 2011) sa tačnošću od 79%.

Dijagnostička snimanja. Radiografija je široko korišćeni metod jer je dostupan i manjim veterinarskim praksama, ali ovaj metod nije dovoljno osetljiv da se njime mogu procenjivati metastaze u limfne čvorove ili druga meka tkiva. Kod tumora mlečne žlezde kuja radiografija je najvažnija u proceni metastaza u tkivo pluća. Toraks bi trebalo snimiti u tri projekcije i to ventro-dorzalnoj, desnoj lateralnoj i levoj lateralnoj (Cassali et al., 2011). Ultrasonografija se može koristiti da bi se utvrdilo prisustvo potencijalnih metastaza na unutrašnjim organima. Napredne metode snimanja kao što su magnetna rezonanca i kompjuterska tomografija se koriste da bi se utvrdilo prisustvo mikrometastaza, ali se u svakodnevnom radu ove metode veoma ograničeno koriste, jer nisu dostupne svim veterinarskim praksama.

Patohistologija predstavlja zlatni standard u postavljanju precizne dijagnoze tumora mlečne žlezde. Omogućava izučavanje patohistoloških karakteristika tumora kao što su mitotski indeks, diferencijacija,

stepen pleomorfizma ćelija, prisustvo nekroze i invazija krvnog i limfnog sistema neoplastičnim ćelijama (Cassali et al., 2011). Najčešće je bojenje hematoksilin-eozinom po utvrđenim protokolima dovoljno kako bi se dijagnostikovao tip tumora mlečne žlezde, ali pojedine podtipove tumora mlečne žlezde je teže dijagnostikovati uobičajenim bojenjima, pa se mora pristupiti specijalnim procedurama bojenja i imunohistohemijskim tehnikama kako bi se dobila precizna dijagnoza (Matos et al., 2012).

### **Terapija kod tumora mlečne žlezde kuja**

Hirurška ekscizija tumora je preporučena i najčešće korišćena metoda za lečenje tumora mlečne žlezde. (Cassali et al., 2011; Novosad, 2003). Invazivnost hirurške metode zavisi od tipa tumora i njegovih karakteristika. Veličina i lokalizacija promena, stepen zahvaćenosti okolnog tkiva i limfnog sistema se procenjuju kako bi se odredila hirurška metoda za odstranjivanje tumora.

Nodulektomija je minimalno invazivna tehnika koja se koristi u slučajevima kada je veličina tumora od 0,5- 1 cm, kada tumor nije adhezivan ni invazivan i kada je benigne prirode. Ovom tehnikom, nakon pravljenja malog reza na koži, tupom preparacijom i odvajanjem od okolnog tkiva, nodul se izvlači forcepsom uz minimalnu traumu. Ekscizion biopsija se takođe može vršiti na ovaj način (Papazoglou et al., 2014). Nodulektomija malignih masa gotovo uvek dovodi do ponovnog pojavljivanja tumora i treba je izbegavati. U ovim slučajevima treba obezbediti širu marginu od najmanje 2cm u svim pravcima duž linije eliptičnog reza na koži koja prekriva tumor. Rez na koži se zatvara pojedinačnim šavovima.

Mastektomija pojedinačne žlezde podrazumeva resekciju jedne mamarne žlezde sa tkivom tumora i koristi se kod tumora koji zahvataju centralne delove mlečne žlezde i nisu u vezi sa ostalim mlečnim žlezdama. Eliptični rez na koži se pravi oko zahvaćene žlezde sa marginama 2cm od zdravog tkiva. Abdominalnu mišićnu fasciju i mišiće abdominalnog zida treba obrezati ukoliko su i oni zahvaćeni.

Regionalna mastektomija je indikovana u slučajevima kada je tumor zahvatio dve uzastopne žlezde ili je lokalizovan između dve žlezde. Obično se ovim pristupom uklanjaju od prve do treće mlečne žlezde i od treće do pete, en block metodom, zajedno sa ingvinalnim limfnim čvorovima, bez obzira na to da li na njima postoje znaci patologije. Nasuprot tome, aksilarni limfni čvorovi se resekiraju samo u slučajevima kada na njima postoje promene, odnosno ukoliko su uvećani, pričvršćeni za tkivo, ili citološki i histološki invadirani ćelijama tumora. Ovaj metod se primenjuje na ovakav način usled toga što tumori mlečne žlezde obično metastaziraju limfnim putem (Papazoglou et al., 2014). U poslednje vreme, vrši se mapiranje sentinel limfnih čvorova putem limfografije i na ovaj način se može detektovati koji limfni čvorovi dreniraju limfu tumora i koji su pod rizikom od metastaza. Ovi nalazi mogu biti od pomoći hirurzima da intraoperativno donesu odluku o uklanjanju limfnih čvorova uz tumor, a naročito je značajno prilikom uklanjanja nepristupačnih aksilarnih limfnih čvorova. U ovom trenutku mapiranje sentinel limfnih čvorova se još uvek ne smatra prognostičkim indikatorom kod tumora mlečne žlezde pasa (Papazoglou et al., 2014).

Unilateralna mastektomija je radikalna hirurška metoda koja podrazumeva odstranjivanje od prve do pete mlečne žlezde u nizu sa iste strane i sa pripadajućim limfnim čvorovima. Izvodi se kod prisustva tumora u više mlečnih žlezda ili u nizu i često se brže i lakše izvodi u odnosu na više pojedinačnih mastektomija.

Bilateralna mastektomija podrazumeva odstranjivanje od prve do pete mlečne žlezde u nizu sa obe strane sa pripadajućim limfnim čvorovima.

Mastektomija započinje eliptičnim rezom na koži i potkožnom tkivu oko tumorom zahvaćene mlečne žlezde sa marginama od 1-2cm od zdravog tkiva i nastavlja se do pektoralnih mišića i fascije ravnog trbušnog mišića (m. rectus abdominis) i kosog trbušnog mišića (m. obliquus abdominis). Nastavlja se sa odvajanjem kože od kranijalnog ka kaudalnom delu, što se može lakše postići primenom elektrohirurških metoda ili tupom preparacijom tkiva hirurškim instrumentima. Ukoliko promenama nisu zahvaćene mišićna fascija i sami mišići, žlezda se može odvojiti nežnim povlačenjem. Ipak, ekscizija prve i druge mlečne žlezde zahteva disekciju pektoralnih mišića, dok treća do pete žlezde slabo prijanjaju uz fasciju pa je tako i disekcija malo olakšana. U slučajevima kada se tumor fiksirao za dublja tkiva, disekcijom treba zahvatiti i zdrave fascije i mišiće u okolini tumoroznog tkiva. Krvarenje se zaustavlja

elektrokauterom, a veći krvni sudovi se podvezuju. Od većih krvnih sudova koji se sreću prilikom mastektomije treba napomenuti na nivou prve i druge mlečne žlezde kranijalne superficijalne epigastrične i unutrašnje toraklane krvne sudove, a na nivou pete mlečne žlezde kaudalne superficijalne epigastrične i spoljašnje pudendalne krvne sudove koji vezuju peti mamarni kompleks sa perivulvarnim tkivom. Nakon odstranjivanja tkiva, ranu treba isprati mlakim fiziološkim rastvorom, a celokupno odstranjeno tkivo poslati na patohistološku procenu. Zatvaranje rane nakon mastektomije predstavlja najizazovniji deo operacije, naročito kod odstranjivanja većeg broja mlečnih žlezda. Neophodno je izvršiti obliteraciju mrtvih prostora i voditi računa o tenzionim silama duž linije reza, kako bi se izbegla pojava dehiscencije i otvaranja rane. Kožni rubovi se podminiraju i povlače ka središtu rane pojedinačnim ili kontinuiranim resorptivnim monofilamentnim šavovima, zatim se na sličan način šije i supkutano tkivo. Koža se šije pojedinačnim čvorastim šavom ili stejlerom koristeći monofilamentni ili najlon konac. Nekad je neophodno postaviti drenove kako bi se lakše rešio problem mrtvih prostora. U slučaju velikih rana od mastektomije mogu se koristiti i bilateralni ili unilateralni kožni flapovi radi lakšeg zatvaranja defekta.

Komplikacije nakon mastektomije obično podrazumevaju formiranje seroma, infekciju rane, dehiscenciju, ishemijsku nekrozu, automutilaciju od strane životinje, krvarenje, edem zadnjih ekstremiteta i ponovno javljanje tumora.

Svim jedinkama kod kojih se vrši mastektomija, neophodno je obezbediti adekvatnu analgeziju opioidima. Takođe, preoperativna primena meloksikama (0.2mg/kg/sc) ili postoperativna primena ketamina (700µg/kg/iv) sa dodatnom primenom ketamina na svakih 6 sati (10 µg/kg) putem infuzije pruža adekvatnu analgeziju kod životinja posle mastektomije. (Papazoglou et al., 2014).

Kod malih, neinvazivnih tumora, hirurgija sama može biti dovoljna za izlečenje, dok veći tumori sa loše definisanim marginama zahtevaju i druge vidove terapije. (Cassali et al., 2011).

Hemoterapija predstavlja sastavni deo lečenja tumora mlečne žlezde, ali se još nije efikasno razvila u veterinarskoj medicini kao u humanoj. Najčešće upotrebljavani lekovi u ove svrhe su Doxorubicin koji se može koristiti samostalno ili u kombinaciji sa ciklofosamidima. Carboplatin i Cisplatin se takođe primenjuju, ali su neophodna dodatna istraživanja da bi se utvrdila njihova efikasnost. U poslednje vreme, koristi se Gemcitabin obično u kombinaciji sa lekovima na bazi platine, kao što je Carboplatin (Cassali et al., 2011).

Anti-inflamatorni lekovi. Kod pasa sa inflamatornim karcinomom mlečne žlezde, kod koga se obično ne preporučuje hirurška terapija, lečenje piroksikamom dovodi do kliničkog poboljšanja i poboljšanja kvaliteta života, sa produžavanjem vremena preživljavanja u odnosu

Hormonska terapija je u začetku u veterinarskoj medicini i koristi se kod kuja sa estrogen receptor-pozitivnim (ER+) tumorima mlečne žlezde. Tamoxifen (antiestrogeni agens) se preporučuje u terapiji ER+ tumora mlečne žlezde kod kuja, ali su rezultati konfliktni.

Terapija zračenjem se ne koristi često kao primarna terapija u lečenju tumora mlečne žlezde kuja, osim kod inoperabilnih tumora kao što je inflamatorni karcinom, ili kod nepotpune resekcije tumorskog tkiva i kao palijativna terapija. Glavne mane radioterapije su razvoj sekundarnih tumora i nekroza (Looper, 2007).

Viroterapija odnosno upotreba virusa u lečenju tumora mlečne žlezde je od sve većeg značaja u humanoj medicini, ali još nije u širokoj upotrebi. U veterinarskoj medicini sprovedena su istraživanja na miševima koja su dala ohrabrujuće rezultate. Utvrđeno je da reovirusi u kombinaciji sa citotoksičnim hemoterapeutičima primenjenim na nivou ćelija mlečne žlezde, pojačavaju njihov citotoksični efekat (Igase et al., 2016). Reovirus samostalno povećava apoptozu tumorskih ćelija. Drugo istraživanje je pokazalo da paramyxovirusi ubijaju 50-80% tumorskih ćelija kad se aplikuju u ćelijske linije i da je progresija tumora supresirana u grupama miševa tretiranih virusom (Shoji et al., 2016).

COX-2 inhibitori. Aspirin smanjuje ekspresiju COX-2 i inhibira rast raznih vrsta tumorskih ćelija tako što uzrokuje zastoj ćelijskog ciklusa tumoroznih ćelija u G0/G1 fazi, a takođe učestvuje i u njihovoj apoptozi. Visoka ekspresija COX-2 je identifikovana kod mnogih tipova tumora uključujući i tumor mlečne žlezde. Iako je važna uloga aspirina u inhibiciji rasta tumora i sprečavanja njegovog ponovnog pojavljivanja utvrđena, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni svi mehanizmi njegovog delovanja na tumorske ćelije (Yang et al., 2017).



**Literatura**

1. Sorenmo K.U., R. Rasotto , V. Zappulli , and M. H. Goldschmidt. *Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. Veterinary Pathology* 48(1) 85-97; 2011.
2. Sahabi K., S. K. Rajendren, J. N. Foong and G.T. Selvarajah. *Mammary Gland Tumours in the Dog, a Spontaneous Tumour Model of Comparative Value to Human Breast Cancer. Review Article. Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 41 (2):541 – 574; 2018.
3. Kaszak I., A. Ruszczak, S. Kanafa, K. Kacprzak, M. Król, P. Jurka. *Current biomarkers of canine mammary tumors. Acta Vet Scand.* 60: 66; 2018.
4. Gundim L.F., C. P. de Araújo, W. T. Blanca, E. C. Guimarães, and A. A. Medeiros. *Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. Can J Vet Res.* 80(4): 318–322; 2016.
5. Salas Y., A. Márquez, D. Diaz, and L. Romero. *Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. PLoS One.* 10(5); 2015.
6. Philibert J.C., P.W. Snyder, N. Glickman , L.T. Glickman , D.W Knapp , D.J. Waters . *Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. J Vet Intern Med.* 17(1):102-6; 2003.
7. Ariyaratna H., N. de Silva, D. Aberdein, D. Kodikara, M. Jayasinghe, R. Adikari, J.S. Munday. *Clinicopathological Diversity of Canine Mammary Gland Tumors in Sri Lanka: A One-Year Survey on Cases Presented to Two Veterinary Practices. Vet Sci.* 5(2): 46; 2018.
8. Cassali G.D., A.C. Bertagnolli, E. Ferreira, K.A. Damasceno, C. de Oliveira Gamba, and C. Bonolo de Campos. *Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. Vet Med Int.* 27460; 2012.
9. Kumar P., R.V.S. Pawaiya, B.P. Madhu. *Multiple mammary tumours in a bitch: analysis of mitotic index, AgNOR count and c-erbB2 expression status: a case report. Veterinarni Medicina,* 55(12): 631–635; 2010.
10. Kamiguchi I.E., I.M. Moreira, T. F. Da Silva, F.S. Zahn, A. Hataka and N. Sousa Rocha. *Mammary Neoplasms in Female Dogs: Identification of Cytopathological Criteria for Malignancy. J Cytol Histol* 7: 392; 2016.
11. Atanaskova Petrov E., K. Ilievska, P. Trojancanec, I. Celeska, G. Nikolovski, I. Gjurovski, T. Dovenski. *Canine Mammary Tumours - Clinical Survey. Mac Vet Rev* 37 (2): 129-134; 2014.
12. Goldschmidt M., L. Pen, R. Rasotto, V. Zappulli. *Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. Veterinary Pathology* 48(1): 117-131; 2011.
13. Munsef A., Al-Mansour, A.G. Mahir, A. Seham Kubba, Al-Azreg and S.A. Dribika. *Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. Open Veterinary Journal.* 8(3): 243-249; 2018.
14. Dolka I., M. Czopowicz, A. Gruk-Jurka, A. Wojtkowska, R. Sapiernyński, P. Jurka. *Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. PLoS ONE* 13(1): e0191595; 2018.
15. Serin G., A. Aydogan. *Chondrosarcoma in the mammary gland of a bitch: a case report. Veterinarni Medicina,* 54(11): 543–546; 2009.
16. Jong-Hyuk Kim, Keum-Soon Im, Na-Hyun Kim, Seung-Ki Chon, Alan R. Doster, Jung-Hyang Sur. *Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23(5) 1079–1082; 2011.
17. Buğra Kivrak M., I. Aydin. *Treatment and Prognosis of Mammary Tumors in Bitches. Inter J Vet Sci.* 6(4): 178-186; 2017.
18. Nordin M. L., A. Y. Osman, R. Shaari, M. M. Arshad, A. A. Kadir, M. F. Hanif Reduan. *Recent Overview of Mammary Cancer in Dogs and Cats: Classification, Risk Factors and Future Perspectives for Treatment. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS).* 10 (8): 64–69; 2017.
19. Dias M.L.M. , J. M. Leon Andrade, M. B. de Castro, P. D. Galera. *Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects Pesq. Vet. Bras.* 36 (3); 2016.
20. Papazoglou L.G., E. Basdani, S. Rabidi, M.N. Patsikas, M. Karayiannopoulou. *Current Surgical Options for Mammary Tumor Removal in Dogs. J Veter Sci Med* 2(1): 6; 2014.
21. Looper J.S. *Fat necrosis simulating recurrent neoplasia following external beam radiotherapy in a dog. Vet Radiol Ultrasound.* 48(1):86-8; 2007.
22. Igase M., C.C. Hwang, S. Kambayashi, M. Kubo, M. Coffey, T. S. Miyama, K. Baba, M. Okuda, S. Noguchi, T. Mizuno. *Oncolytic reovirus synergizes with chemotherapeutic agents to promote cell death in canine mammary gland tumor. Can J Vet Res.* 80 (1):21–31; 2016.

23. Shoji K., M. Yoneda, T. Fujiyuki, Y. Amagai, A. Tanaka, A. Matsuda, K.Ogihara, Y.Naya, F. Ikeda, H. Matsuda, H. Sato, C. Kai. Development of new therapy for canine mammary cancer with recombinant measles virus. *Mol Ther Oncolytics*. 3: 15022; 2016.
24. Yang C., J. Liu, Y. Wang, J. Tong, Y. Wu, Y. Liu. Aspirin inhibits the proliferation of canine mammary gland tumor cells in vitro and in vivo. *Transl Cancer Res* 6(1):188-197; 2017.
25. Sultan F., B.A. Ganaie. Comparative oncology: Integrating human and veterinary medicine. *Open Vet J*. 8(1): 25–341; 2018.
26. Banco B., E. Antuofermo, G. Borzacchiello, P. Cossu-Rocca, V. Grieco. Canine ovarian tumors: an immunohistochemical study with HBME-1 antibody. *J Vet Diag Inv* 23(5) 977–981; 2011.
27. Best M.P., A. E. Frimberger. Ovarian carcinomatosis in a dog managed with surgery and intraperitoneal, systemic, and intrapleural chemotherapy utilizing indwelling pleural access ports. *Can Vet J* 58:493–497; 2017.
28. Arlt S.P., P. Haimperl. Cystic ovaries and ovarian neoplasia in the female dog – a systematic review. *Reprod Dom Anim* 51 (1): 3–11; 2016.
29. Baba A. I. and C. Cătoi. Female genital tract tumors. *Comparative Oncology*. Chapter 10: (10.1-10.5); 2007.
30. Veiga G.A.L., A. Barbosa, K.S. D'Oliveira, C. Brito, F. Kitahara, J.F. Frignani, M.A.B. Iannone, F.P. Pereira, C.P. Carramenha. Retrospective Study of Tumors at the Genital Tract of Dogs Presented at the Veterinary Hospital of Unisa During the Period of February 2000 to December 2008. *WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS PROCEEDINGS*, 2009.
31. Patsikas M., L. G. Papazoglou, S. Jakovljevic, N. G. Papaioannou, P. L. Papadopoulou, C. B. Soultani, I. A. Chryssogonidis, K. A. Kouskouras, N. E. Tziris, A. A. Charitanti. Radiographic and Ultrasonographic Findings of Uterine Neoplasms in Nine Dogs. *JAAHA* 50:5; 2014.
32. Chen V.W., B. Ruiz, J.L. Killeen, T. R. Cote, X. C. Wu, C. N. Correa. Pathology and Classification of Ovarian Tumors. *CANCER Supplement* 97 (10); 2003.
33. Kurman R.J., I.M.Shih. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol*. 34(3): 433–443; 2010.
34. Oliveira A.R., M. C. Flecher, F. F. Jabour, T. D. Souza, I. Hardt, F.T. Vieira, A. C. Rassele, G.C. Vicente, F. M. Machado. Dysgerminoma and granulosa cell tumor in a bitch. *Braz J Vet Pathol*. 9(1): 31 – 33; 2016.
35. Hidaka Y., A. Kodama, R.Tamura, M. Ito, K. Koike, T. Hirai, H. Satoh, and M.Hagio. A Canine Case of Ovarian Carcinoma with Pulmonary Metastasis Treated with Surgery and Paclitaxel / Platinum Combination Chemotherapy. *J Jpn Vet Cancer Soc*. 5(1): 6-11; 2014.
36. Serin G., A. Aydogan, R. Yaygingul, R. Tunca. Uterine leiomyosarcoma in a dog: a case report. *Veterinarni Medicina* 55 (8): 405–408; 2010.
37. Karunakaran S., U. N. Pillai, A. M. Kuriakose and K.T. Rajimon. Uterine leiomyoma in Rottweiler dog- A case report. *Indian J. Vet. Pathol*. 37(1): 93-94; 2013.
38. Mohan D., S.K. Maiti, S. S, Ramith KR, S. P, Bindhuja, B.V Naveen Kumar. Surgical management of multiple uterine tumours in a dog. *MOJ Anat & Physiol*. 5(2):117–118; 2018.
39. Igna C., D.Bumb, A. Proteaza, R. Dascalu, L. Schuszler, V. Igna, and D. Brezovan. Subtotal Vaginectomy as a Treatment for Vaginal Tumours in Two Bitches. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 73 (1); 2016.
40. Ganguly B., U. Das, A. K. Das. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet Comp Onc*. 14(1): 1–12; 2013.
41. da Silva D. M., M. S. de Oliveira Reusing, A. I. Franciosi, C. E. Penner Belo, K. A. Goncalves, R. S. de Sousa, S. D. Guerios. Treatment of canine transmissible venereal tumor using L-asparaginase, prednisone, and surgery in a clinical chemotherapy-resistant case. *Turk J Vet Anim Sci* 38: 220-223; 2014.

## **ZNAČAJ NEESTERIFIKOVANIH MASNIH KISELINA (NEFA) U PROCENI METABOLIČKOG STATUSA KRAVA U RANOJ LAKTACIJI**

Jovan Stanojević, Miodrag Radinović, Marko Cincović, Branislava Belić

Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

\*Autor za kontakt: [jovan2912@email.com](mailto:jovan2912@email.com)

### **Sažetak**

U ranoj laktaciji dolazi do mobilizacije lipida iz telesnih depoa, kako bi se zadovoljile energetske potrebe. Povećana mobilizacija lipida dovodi do povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina (NEFA) u krvi, posledično i do povećanja koncentracija beta-hidroksibutirata (BHB) u krvi. Povećana ketogeneza u hepatocitima dovodi do velikog broja metaboličkih adaptacija. Cilj ovog rada je da se ispita veza između koncentracije NEFA i drugih parametara metaboličkog profila, kao i značaj NEFA u proceni metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji. Ogled je izveden na farmama visokomlečnih krava u Vojvodini. U ogled je uključeno 15 krava holštajn-frizijske rase, na početku laktacije, od 1. do 5. dana nakon telenja. Određena je koncentracija: NEFA, BHB, glukoze, triglicerida, albumina, uree, bilirubina, AST. Veza je ispitana analizom linearnog modela i korelacionom analizom. Rezultati ispitivanja pokazuju da u ranoj laktaciji vrednosti NEFA u linearnom modelu pokazuju značajnu korelaciju sa: BHB, TGL, AST i bilirubinom – pozitivno, dok je korelacija sa glukozom negativna. Albumin i urea ne pokazuju značajnu linearnu korelaciju sa vrednostima NEFA. Navedeni rezultati pokazuju da se upotreba NEFA u proceni metaboličkog statusa može ograničeno koristiti. Koncentracija NEFA ima značaja u proceni energetskog statusa krava (negativna linearna korelacija sa glukozom), kao i u proceni funkcionalnog statusa hepatocita (pozitivna linearna korelacija sa bilirubinom i AST).

Ključne reči: krave, metabolički profil, NEFA

### **Abstract**

In early lactation, lipids are mobilized from body depots, in order to satisfy energy needs. Increased lipid mobilization leads to an increased concentration of free fatty acids (NEFA) in the blood, and consequently to an increase in the concentrations of beta-hydroxybutyrate (BHB) in the blood. Increased ketogenesis in hepatocytes leads to a large number of metabolic adaptations. The aim of this study was to examine the relationship between important metabolic profile parameters and NEFA concentration. The experiment was performed on farms of high-milk cows in Vojvodina. The experiment included 15 Holstein-Friesian cows, at the beginning of lactation, from the 1st to the 5th day after calving. The concentration was determined: NEFA, BHB, glucose, triglycerides, albumin, urea, bilirubin, AST. The relationship was examined by linear model analysis and correlation analysis. The test results show that in early lactation NEFA values in the linear model show a significant correlation with: BHB, TGL, AST and bilirubin - positive, while the correlation with glucose is negative. Albumin and urea do not show a significant linear correlation with NEFA values. These results indicate that the use of NEFA in the assessment of metabolic status can be used to a limited extent: so that it significantly represents the energy balance of cows (negative linear correlation with glucose) and functional status of hepatocytes (positive linear correlation with bilirubin and AST).

Key words: cows, metabolic profile, NEFA

### **Uvod**

Poremećaji metabolizma u ranoj laktaciji imaju značajne negativne efekte na zdravlje i dobrobit krava, kao i na profitabilnost farmi (23). Ranu laktaciju karakteriše visok katabolizam lipida (visok

NEFA) i nizak anabolički kapacitet (4). U ranoj laktaciji dolazi do negativnog energetskeg bilansa i povećanja potrošnje sopstvenih masnih rezervi u energetske svrhe kod krava. Tada nastaje lipidna mobilizacija koja se odlikuje povećanom koncentracijom neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u krvi krava. Ove masne kiseline putem krvotoka odlaze u jetru, gde se koriste za energetske svrhe, kada se metabolisu do ugljendioksida i vode, kao i sva organska jedinjenja. Međutim, povećano opterećene ćelija jetre sa NEFA dovodi do parcijalne oksidacije ovih masnih kiselina, kada dolazi do razvoja procesa ketogeneze uz povećanu koncentraciju beta-hidroksibutirata. Prekomerna mobilizacija telesnih rezervi uključuje povećanje cirkulišućeg BHB i nesterifikovanih masnih kiselina (9). Tada dolazi do nastanka masne infiltracije hepatocita (12,20). Negativni energetskeg bilans i povećana lipidna mobilizacija i ketogeneza dovode do brojnih metaboličkih adaptacija u ranoj laktaciji, a to su: povećana koncentracija neesterifikovanih masnih kiselina, smanjena koncentracija glukoze, albumina, smanjena koncentracija uree, povećana aktivnost jetrinih enzima, snižena koncentracija holesterola i triglicerida, a javljaju se i brojne hematološke adaptacije (3,11). U radovima Đokovića i sar. (2011), Gonzáles-a i sar. (2011) i Cincovića i sar. (2012) nađeno je da metabolički status zavisi od lipidne mobilizacije i ketogeneze kod krava u ranoj laktaciji, što je u vezi sa nastankom masne jetre kod krava, kao centralnom organu adaptacije na negativni energetskeg bilans.

Navedene činjenice upućuju na mogućnost metaboličkih poremećaja u mlečnih krava, naročito u razdoblju neposredno posle porođaja. U ranoj laktaciji, mlečne krave obično imaju negativan energetskeg bilans koji je povezan sa metaboličkim poremećajima, ugroženim zdravljem i plodnošću i smanjenim produktivnim životnim vekom (27). Učestalost pojave masne jetre kod mlečnih krava najveća je do 40. dana nakon teljenja. Sve to ukazuje na važnost istraživanja energetskeg metabolizma upravo u razdoblju pre teljenja kao i u ranoj laktaciji. Na znatnu učestalost poremećaja energetskeg metabolizma u krava utiče i činjenica da su preživari u održavanju glikemije, za razliku od monogastričnih životinja, u najvećoj meri zavisni od glukoneogeneze. Znatna količina glukoze koja se iskorišćava u mlečnoj žlezdi za potrebe sinteze laktoze, smanjuje već nisku količinu glukoze u krvi mlečne krave. Kao posledica pada glukoze u krvi, javlja se hipoinsulinemija, što dalje utiče na povećanje lipolize i porast koncentracije NEFA u krvi (26). Većina tkiva iskoristi NEFA iz krvi, u najvećoj meri jetra, skeletni i srčani mišić, za dobijanje energije putem beta-oksidacije u mitohondrijima (26). One se iskorišćavaju i u mlečnoj žlezdi za sintezu mlečne masti. Povećana koncentracija NEFA u plazmi može doprineti negativnoj energetskeg ravnoteži, budući da se kod mlečnih krava dovodi u vezu i sa smanjenim unosom hrane (20). U jetri se iz NEFA sintetišu i trigliceridi te se oslobađaju u krvotok kao sastojak VLDL (7). Sposobnost jetre preživara za otpuštanje VLDL u krvotok je ograničena, pa se u višku NEFA sintetiše velika količina triglicerida u jetri, koja se ne može u potpunosti otpustiti u krvotok. Posledica toga zastoja je nakupljanje triglicerida u ćelijama jetre (26), pojava koja je u većem ili manjem stepenu prisutna u mlečnih krava pre porođaja i u početku laktacije.

Preventivni pristup metaboličkim poremećajima je određivanje biohemijskih pokazatelja energetskeg statusa u krvi u razdoblju oko porođaja, na određenom broju životinja iz stada, zatim pravovremena korekcija ishrane (8). Kao najpouzdaniji pokazatelji negativne energetske ravnoteže i predispozicije za ketozu mogu se koristiti koncentracije NEFA i BHB u krvnoj plazmi/serumu. Ipak, potpunija slika o energetskeg statusu može se dobiti samo istovremenim određivanjem ostalih pokazatelja, a to su: visina glukoze, triglicerida, holesterola, a funkcionalni status jetre može se proceniti na osnovu albumina, uree, bilirubina i jetrinih enzima. NEFA nastaje kao proizvod mobilizacije zaliha triglicerida u masnom tkivu prenose se krvlju uglavnom vezane na albumine. Ako koncentracija NEFA u krvnoj plazmi znatno poraste, zbog ograničenog kapaciteta vezivanja za albumine, porašće udeo NEFA nevezanih za albumine (7). NEFA nevezane za albumine imaju toksične efekte na membranama ćelija (6). Kod krava obolelih od ketoze utvrđena je visoka koncentracija NEFA (18). Carvalho i sar. (2019) izvestili su da je koncentracija NEFA  $\geq 0,70$  mmol / L potencijalno upozorenje za postpartalne zdravstvene problem, tj. koncentracija BHB  $\geq 1,2$  mmol / L koristi se za definisanje hiperketonemije i povezana je sa ketozom (5). Rabelo i sar. (2005) utvrdili su da ishrana mlečnih krava obrocima sa višom energetskeg vrednošću rezultira nižom koncentracijom NEFA sedmog dana po teljenju. Holtenius (1989) u krvnoj plazmi krava u razdoblju oko teljenja utvrdio je porast NEFA od šestog dana pre teljenja do prvog dana

nakon teljenja, te njihov pad posle teljenja. Nivo TG u serumu je pokazatelj hepatične funkcionalnosti i pad njihove koncentracije može ukazivati na infiltraciju masti u jetri (16).

Cijl ovog rada je da se ispita veza između koncentracije NEFA i parametara metaboličkog profila, kao i značaj NEFA u proceni metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji.

### Materijal i metode

Ogled je izveden na farmama visokomlečnih krava u Vojvodini. U ogled je uključeno 15 krava holštajn-frizijske rase, na početku laktacije, od 1. do 5. dana nakon teljenja. Sve životinje uključene u ogled bile su klinički zdrave što je utvrđeno kliničkim pregledom i uvidom u evidenciju podataka o zdravstvenom stanju životinja pre partusa. Prosečna telesna masa krava iznosila je 600 +/- 50kg. Krv je uzimana venepunkcijom V. Jugularis. Određena je koncentracija: NEFA, BHB, glukoze, triglicerida, albumina, uree, bilirubina, AST, pomoću standardnih, komercijalnih kitova (Randox, UK) na aparatu marke Rayto. U periodu ispitivanja krave su hranjene standardnim miksiranim obrocima dva puta dnevno. Optimizacija obroka izvršena je na osnovu telesne mase i faze laktacije. U toku ogleda prećena je i konzumacija obroka odnosno unos suve materije u odnosu na optimalne potrebe za tu kategoriju krava.

Statistički podaci tokom ispitivanja obrađeni su deskriptivnim statističkim parametrima: aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom, standardnom greškom aritmetičke sredine, koeficijentom varijacije. Uticaj i veza između NEFA i drugih parametara metaboličkog profila ispitan je linernom regresijom i korelacijom i prikazan grafički i tabelarno.

### Rezultati

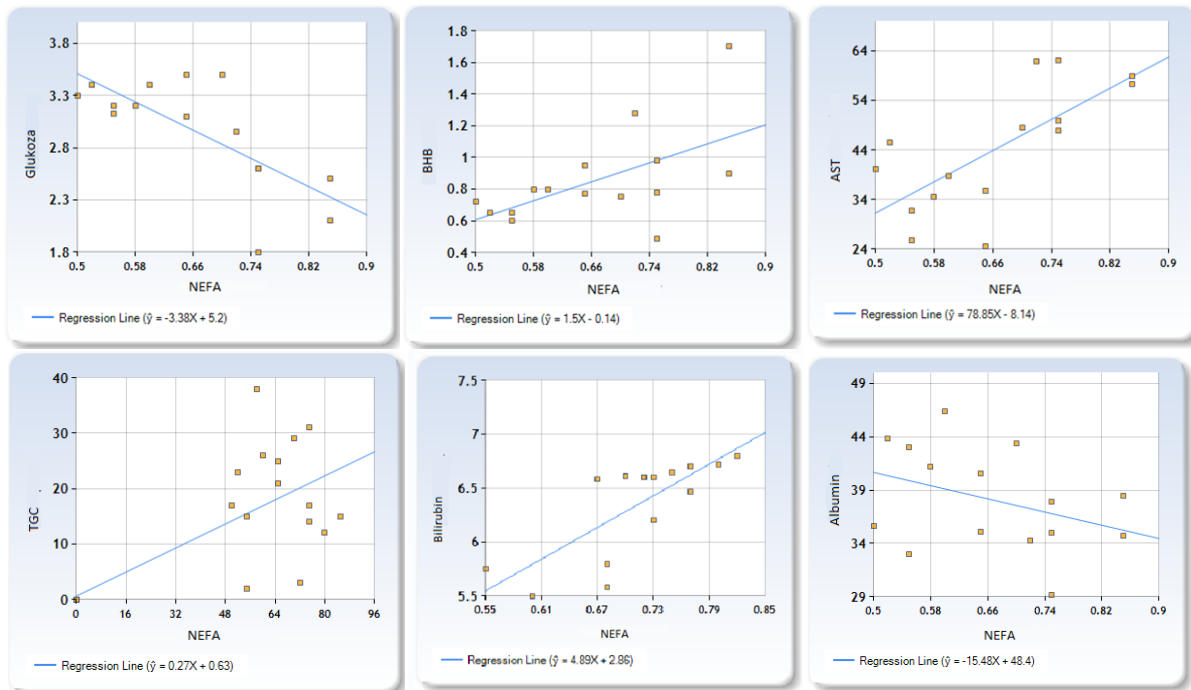
Tabela 1 pokazuje srednju, minimalnu i maksimalnu vrednost za najznačajnije parametre pokazatelje energetskog statusa i funkcionalnog statusa jetre kod krava u postpartalnom periodu.

**Tabela 1** – Sumarne statističke vrednosti za odabrane parametre

	NEFA mmol/l	Glukoza Mmol/l	BHB mmol/l	TGL μmol/l	Albumin g/l	Urea mmol/l	Bilirubin mmol/l	AST mmol/l
Broj krava	15	15	15	15	15	15	15	15
Srednja vrednost	0,665	2,952	0,855	0,22	37,78	4,18	6,480	44,267
SD	0,15	0,521	0,29	0,075	5,17	1,152	0,355	12,51
Minimum	0,52	1,8	0,60	0,12	29,2	2,7	5,55	1,13
Maksimum	0,85	3,7	1,28	0,38	46,4	6,4	6,8	4,37
Rang	0,33	1,9	0,68	0,26	17,2	3,7	1,25	3,24

**Tabela 2** - . Regresiona jednačina i korelaciona analiza između NEFA i drugih metaboličkih parametara

	Regresiona Linearna jednačina	Koeficijent korelacije, determinacije i statistička značajnost
NEFA : Glukoza	$\hat{y} = -3.38138X + 5.19949$	$R = -0.7375$ ( $R^2 = 0,5439$ ); $p < 0,01$
NEFA : BHB	$\hat{y} = 1.4951X - 0.13908$	$R = 0,568$ ( $R^2 = 0,323$ ); $p < 0,05$
NEFA : TGC	$\hat{y} = 0.2712X + 0.63232$	$R = 0,783$ ( $R^2 = 0,61$ ); $p < 0,01$
NEFA : Albumin	$\hat{y} = -15.48258X + 48.40409$	$R = -0,365$ ( $R^2 = 0,133$ ); NS
NEFA : Urea	$\hat{y} = -0.01437X + 4.18955$	$R = -0.0014$ ( $R^2 = 0$ ); NS
NEFA : Bilirubin	$\hat{y} = 4.8885X + 2.86013$	$R = 0,77$ ( $R^2 = 0,59$ ); $p < 0,05$
NEFA : AST	$\hat{y} = 78.84771X - 8.14078$	$R = 0,716$ ( $R^2 = 0,513$ ); $p < 0,01$

**Grafikon 1 – 6:** Prikaz regresione analize za parametre gde su postojale statistički značajne linearne jednačine

## Diskusija

Najkritičniji period za metabolizam visokoproduktivnih krava je prelaz iz perioda zasušenja u fazu rane laktacije. Jedno od obeležja visokog graviditeta je pozitivan bilans energije, a to u punoj meri važi i za završnu fazu laktacije. Životinje u ovom periodu unose veću količinu energije od one koja je stvarno potrebna njihovom organizmu, pa se zbog toga višak unete energije deponuje. Ova pojava se prepoznaje po povećanju telesne mase životinja. Kada pozitivan bilans energije potraje duže, kao što je to slučaj kod slabo plodnih krava, sa dugim servis periodom, pozitivan bilans energije ima kao posledicu gojaznost. U zavisnosti od svoje genetske predispozicije i načina ishrane, visoko - gravidne krave postižu manje ili veće promene u telesnoj kondiciji. Poželjno je da krave odlažu dovoljne količine masti u telesnim depoima energije, ali ne i suvišak masnog tkiva kao preteranu rezervu energije koju će trošiti u toku rane laktacije. Suficit u energiji na kraju laktacije i u zasušenju je osnovni razlog za izraženiji pozitivan bilans energije što ima za posledicu tovnu kondiciju životinja. Pored toga, suvišno deponovana energija u telesnim depoima, zbog prekomerne i nekontrolisane lipomobilizacije predstavlja jedan od osnovnih razloga pojave subkliničkih i kliničkih poremećaja metabolizma.

Najvažniji poremećaji zdravlja kod visoko mlečnih krava nastaju kao posledica poremećaja energetskeg metabolizma. Poznata je činjenica da je za metabolizam visoko mlečnih krava najkritičniji prelaz iz perioda zasušenja u fazu rane laktacije. U ovom periodu drastično se menjaju potrebe organizma u pogledu energije i drugih materija. U visokom graviditetu bilans energije je pozitivan. Odmah posle teljenja, kada započinje laktacija, naglo se povećavaju potrebe organizma za energijom. U uslovima negativnog bilansa energije organizam troši sopstvene rezerve energije, najpre rezerve glikogena, zatim masti, a onda i proteina. Zbog toga se kod krava, koje daju velike količine mleka, u peripartalnom periodu, vrlo često pojavljuju masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre. U najtežim slučajevima bolesti nastaje mršavljenje životinja, difuzno zamašćenje jetre, smanjenje proizvodnih i reproduktivnih sposobnosti, a u nekim slučajevima dolazi i do uginuća.

Metabolički status krava u ranoj laktaciji se odlikuje povećanom koncentracijom BHB, smanjenom koncentracijom glukoze, proteina, albumina, uree Ca i P i povećanu koncentraciju bilirubina. Hachenberg i sar (2007) su izvršili klasifikaciju krava prema vrednosti BHB i našli da krave sa većom vrednosti BHB imaju veću aktivnost enzima jetre kao što je glutamat-dehidrogenaza. Predviđanje vrednosti BHB na osnovu vrednosti parametara u metaboličkom profilu mlečnih krava je moguće, a najznačajniji prediktori ove vrednosti su koncentracija NEFA, ukupnog bilirubina i Ca (25).

U ovom radu ispitana je veza između koncentracije NEFA i drugih metaboličkih parametara, značajnih za procenu metaboličkog statusa krava. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da vrednosti NEFA u linearnom modelu značajno koreliraju sa: BHB, TGL, AST i bilirubinom – pozitivno, dok je korelacija sa glukozom negativna. Albumin i urea ne pokazuju značajnu linearnu korelaciju sa vrednostima NEFA. Rezultati ovih istraživanja se slažu sa rezultatima velikog broja autora (2,14,15,21,22).

### Zaključak

Navedeni rezultati pokazuju da se upotreba NEFA u proceni metaboličkog statusa može ograničeno koristiti. Koncentracija NEFA ima značaja u proceni energetskeg statusa krava (negativna linearna korelacija sa glukozom), kao i u proceni funkcionalnog statusa hepatocita (pozitivna linearna korelacija sa bilirubinom i AST).

### Zahvalnica

Ovo istraživanje je deo projekta „Unapredjenje zdravlja i dobrobiti visokoproduktivnih krava identifikacijom i otklanjanjem stresogenih faktora“ (TP31062).

### Literatura

1. Acorda, J. A., Yamada, H., & Ghamsari, S. M. (1995). *Comparative evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy cattle by using blood and serum analysis, ultrasonography, and digital analysis. Veterinary Quarterly, 17(1), 12-14.*
2. Asl A.N., Nazifi S., Ghasrodashti A.R., Olyaei A. (2011): *Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. Prev Vet Med., 100, 1, 38-43.*
3. Belić B., Cincović M.R., Stojanović D., Kovačević Z., Vidović B. (2010): *Morphology of erythrocyte and ketosis in dairy cows with different body condition, Contemporary agriculture, 59, 306-311.*
4. Belić, B., Cincović, M., Lakić, I., Đoković, R., Petrović, M., Ježek, J., & Starič, J. (2018). *Metabolic status of dairy cows grouped by anabolic and catabolic indicators of metabolic stress in early lactation. Acta Scientiae Veterinariae, 46(1), 9.*
5. Benedet, A., Manuelian, C. L., Zidi, A., Penasa, M., & De Marchi, M. (2019). *Invited review:  $\beta$ -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. animal, 13(8), 1676-1689.*
6. Bobe, G., Young, J. W., & Beitz, D. C. (2004). *Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. Journal of dairy science, 87(10), 3105-3124.*
7. Bruss, M. L. (1997). *Lipids and ketones. In Clinical biochemistry of domestic animals (pp. 83-115). Academic Press.*
8. Calamari, L., Ferrari, A., Minuti, A., & Trevisi, E. (2016). *Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: preliminary results. BMC veterinary research, 12(1), 4.*
9. Carvalho, M. R., Peñagaricano, F., Santos, J. E. P., DeVries, T. J., McBride, B. W., & Ribeiro, E. S. (2019). *Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. Journal of dairy science, 102(12), 11701-11717.*
10. Cincović M.R., Belić B., Radojičić B., Hristov S., Đoković R. (2012): *Influence of lipolysis and ketogenesis to metabolic and hematological parameters in dairy cows during periparturient period. Acta veterinaria 62, 4, 429-444.*
11. Cincović M.R., Belić B., Vidović B., Krčmar Lj. (2011): *Reference values and frequency distribution of metabolic parameters in cows during lactation and in pregnancy, Contemporary agriculture, 60, 175-182.*

12. Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. (2001): Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J.Dairy Sci*, 84(Suppl.), 100-112.
13. Đoković R., Ilić Z., Kurćubić V., Petrović M., Dosković V. (2011): Functional and morphological state of the liver in Simmental dairy cows during transitional period. *Revue Méd. Vét.*, 162, 12, 574-579.
14. Đoković R., Kurćubić V., Ilić Z., Cincović M., Fratrić N., Stanimirović Z., Petrović M.D, Petrović M.P. (2013): Evaluation of the metabolic status of Simmental dairy cows in early and mid lactation. *Animal Science Papers and Reports*, 31, 2, 101-110.
15. Đoković, R., Cincović, M., Belić, B., Toholj, B., Davidov, I., & Hristovska, T. (2015). Relationship between blood metabolic hormones, metabolites and energy balance in Simmental dairy cows during peripartum period and lactation. *Pak. Vet. J*, 35(2), 163-167.
16. Djoković, R., Kurćubić, V., Ilić, Z., Cincović, M., Lalović, M., Jašović, B., & Bojkovski, J. (2017). Correlation between blood biochemical metabolites milk yield, dry matter intake and energy balance in dairy cows during early and mid lactation. *Advances in Diabetes and Metabolism*, 5(2), 26-30.
17. González F.D., Muiño R., Pereira V., Campos R., Benedito J.L. (2011): Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.*, 12, 3, 251-255.
18. Holtenius, P. (1989). Plasma lipids in normal cows around partus and in cows with metabolic disorders with and without fatty liver. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 30(4), 441-445.
19. Hachenberg S., Weinkauf C., Hiss S., Sauerwein H. (2007): Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the peripartal period. *J.Anim. Sci.*, 85, 1923-1932.
20. Ingvarstsen K.L., Andersen H.R. (2000): Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. *J.Dairy Sci.*, 83, 1573-1597.
21. Kovačević M., Šamanc H., Damjanović Z., Košarčić, S. (2002): Koncentracija triglicerida i NEFA u krvi krava u visokom graviditetu i posle teljenja. *Savremena poljoprivreda*, 51, 3-4, 111-113.
22. Krnić J., Pašić-Juhas E., Kanački Z., Hodžić A., Hamamdžić M. (2006): Uticaj nepovoljnih uslova ishrane na karakteristike metaboličkog profila krava. *Savremena poljoprivreda*. 55, 3-4, 136-142.
23. McArt, J. A. A., Nydam, D. V., & Overton, M. W. (2015). Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. *Journal of dairy science*, 98(3), 2043-2054.
24. Rabelo, E., Rezende, R. L., Bertics, S. J., & Grummer, R. R. (2005). Effects of pre-and postfresh transition diets varying in dietary energy density on metabolic status of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4375-4383.
25. Slosarkova S., Fleischer P., Marek J., Penkava O., Skrivanek M. (2011): Prediction of non-esterified fatty acid (NEFA) and beta-hydroxybutyrate (BHB) in blood of dairy cows from values of selected biochemistry parameters on day one post partum. *Veterinarska stanica, suplement 1*, 166-170.
26. Vernon, R. G. (2005). Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *The Journal of dairy research*, 72(4), 460.
27. Xu, W., Vervoort, J., Saccenti, E., van Hoeij, R., Kemp, B., & van Knegsel, A. (2018). Milk metabolomics data reveal the energy balance of individual dairy cows in early lactation. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.



## **BIOHEMIJSKE ANALIZE KRVI KAO INDIREKTNA METODA DIJAGNOSTIKE SUBKLINIČKE HROMOSTI KONJA**

Tijana Kukurić, Mihajlo Erdeljan

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

\* Autor za kontakt: [tijana.kukuric@gmail.com](mailto:tijana.kukuric@gmail.com)

### **Sažetak**

Značajni ekonomski gubici usled velike prevalencije hromosti kod sportskih konja predstavljaju dobro poznati problem. Bilo koji napredak u prevenciji, dijagnozi, lečenju ili prognozi u ovoj oblasti bi stoga bio veoma značajan. U medicinskoj praksi za dijagnostikovanje i prognostičko praćenje oboljenja najčešće se koriste laboratorijska dijagnostička određivanja. Analitičke laboratorijske metode i postupci se danas u najvećoj meri razvijaju za tzv. biomarkere, odnosno biohemijske pokazatelje oboljenja pojedinih organa, čije koncentracije se mogu izmeriti biohemijskim analizama krvi. Kada je mehanički integritet tkiva ugrožen bolešću, velikim opterećenjima i treninzima, simptomi sa napredkom bolesti postaju uočljivi. Međutim, oboljenja često protiču neotkrivena u subkliničkom obliku, iz tog razloga, značaj pomenutih analiza je veći. Biohemijskim ispitivanjem, određuje se nivo biomarkera metabolizma koštanog i hrskavičnog tkiva, koji nastaju kao produkti stvaranja ili razgradnje tkiva. Ispitivanje biomarkera sa ciljem praćenja razvoja skeleta, prevencije oboljenja i praćenja terapijskog protokola, predstavlja značajan korak u medicini, iz više razloga. Nedovoljno istražena oblast omogućava nam da sprovedemo detaljnija istraživanja, obezbedimo relevantnije podatke i otvorimo prostor za nova dostignuća u oblasti preventivne i dijagnostičke medicine, što je ujedno cilj ovog rada.

Ključne reči: biomarkeri, biomarkeri konja, hromost, skeletni biomarkeri

### **Abstract**

Significant economic losses due to the high prevalence of lameness in sport horses are a well-known problem. Any progress in prevention, diagnosis, treatment or prognosis in this area would therefore be very significant. In medical practice, laboratory diagnostic determinations are most often used for diagnosing and prognostic monitoring of diseases. Today, analytical laboratory methods and procedures are mostly being developed for the so-called biomarkers, ie biochemical indicators of diseases of individual organs, whose concentrations can be measured by biochemical blood tests. When the mechanical integrity of the tissue is endangered by the disease, heavy loads and trainings, the symptoms become noticeable with the progress of the disease. However, the diseases often go undetected in a subclinical form, for that reason, the significance of the mentioned analyzes is greater. By biochemical examination, the level of biomarkers of bone and cartilage metabolism is determined, which are formed as products of tissue formation or decomposition. The study of biomarkers with the aim of monitoring skeletal development, disease prevention and monitoring of the therapeutic protocol, is a significant step in medicine, for several reasons. Insufficiently researched area enables us to conduct more detailed research, provide more relevant data and open space for new achievements in the field of preventive and diagnostic medicine, which is also the goal of this paper.

Key words: biomarkers, horse biomarkers, lameness, skeletal biomarkers

### **Uvod**

Značajni ekonomski gubici usled velike prevalencije hromosti kod sportskih konja predstavljaju dobro poznati problem. Bilo koji napredak u prevenciji, dijagnozi, lečenju ili prognozi u ovoj oblasti bi stoga bio veoma značajan, a u tu svrhu, biomarkeri mogu biti vrlo korisni (1).

U medicinskoj praksi za dijagnostikovanje i prognostičko praćenje oboljenja najčešće se koriste laboratorijska dijagnostička određivanja, tj. dijagnostički testovi (2). U zavisnosti od vrste oboljenja i ispitivanog parametra, razlikuju se i metode ispitivanja (1). Dijagnostička ispitivanja su u izvesnoj meri praćena nesigurnošću koja može da potekne od netačnosti samog dijagnostičkog testa ili netačnosti kliničkog sagledavanja stanja pacijenta ili interpretacije dijagnostičkog testa (2). Nesigurnost koju uslovljava prvi navedeni uzrok danas je u najvećoj meri smanjena razvojem novih, pogodnijih analitičkih postupaka i posvećivanjem više pažnje sprovođenju kontrole kvaliteta u laboratorijama. Analitičke laboratorijske metode i postupci se danas u najvećoj meri razvijaju za tzv. biomarkere, odnosno biohemijske pokazatelje oboljenja pojedinih organa koji moraju da imaju niz specifičnih karakteristika da bi ispunili uslov da se primene kao biohemijski markeri za otkrivanje i razlikovanje pojedinih oboljenja datog organa (2,3). Primenom ovakve definicije približavamo se tzv. organspecifičnosti nekog biohemijskog parametra koja se primenjuje u kliničkoj enzimologiji, mada u ograničenoj meri (2).

Identifikacija biomarkera se odnosi na analize u biološkim uzorcima i svako merenje koje predviđa stanje bolesti ili odgovor na terapiju, a takav činoc se može nazvati biomarkerom. Biomarkeri mogu ukazivati na prisustvo ili verovatnoću za razvoj određene bolesti (4). Definicija biomarkera varira, ali možemo reći da je to parametar koji je objektivno izmeren i ocenjen kao pokazatelj normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili nastaje kao farmakološki odgovor na terapijsku intervenciju. Biomarkeri mogu biti anatomske, fiziološke, biohemijske ili molekularne parametri koji su povezani sa određenim bolestima i mogu se otkriti različitim metodama, koje uključuju kliničko posmatranje, laboratorijske testove i snimanje (5). Da bi se utvrdilo da li neki od biohemijskih pokazatelja ispunjava navedene uslove za uspešnu primenu u dijagnostikovanju, mora se podvrći odgovarajućoj proceni, odnosno evaluaciji. Na ovaj način se uspostavlja veza između rezultata koji se za odabrani pokazatelj dobijaju i klinički definisane krajnje tačke (npr. prisustvo ili odsustvo oboljenja). Naime, mora se tačno definisati namena biomarkera, kako bi se njegovom primenom dobila odgovarajuća dijagnostička korisnost. Ova vrsta procene danas se postiže odgovarajućim dizajniranjem proučavanja i statističkom evaluacijom rezultata (2, 6).

Laboratorijski testovi za procenu metabolizma koštanog tkiva podrazumevaju određivanje statusa minerala i markera sinteze i resorpcije kostiju. U toku procesa formiranja kostiju osteoblasti sekretuju osteokalcin, peptide prokolagena tipa I i alkalnu fosfatazu (ALP), dok se tokom procesa razgradnje kostiju oslobađaju piridinolini, kao i N i C terminalni telopeptidi kolagena tipa I. Povišene vrednosti koštanih biomarkera u serumu ili urinu ukazuju na viši stepen remodelovanja kostiju, odnosno na povećan gubitak koštane mase (6, 7).

Kod takmičarskih konja bolesti skeletnog sistema predstavljaju čest uzrok gubitka performansi (8). Stoga, hromost takođe ima veliki ekonomski uticaj u industriji konja. Poremećaji kostiju i zglobova utiču na industriju konja, gubitak uzgojnog potencijala i smanjena tržišne vrednosti obolelih (9). Iz tog razloga, poboljšanje u prevenciji, dijagnozi, lečenju ili prognoza u ovoj oblasti, biomarkeri mogu biti korisni vrlo korisni (1).

Cilj ovog rada jeste da se objedine dosadašnja znanja o biomarkera koji prate uzroke hromosti konja, da pruži relevantne činjenice i zaključke i otvori prostor za nova dostignuća u oblasti preventivne i dijagnostičke medicine.

### **Skelet konja**

Primarno formiranje skeleta počinje još tokom fetalnog razvoja, međutim ono nije konačno i nastavlja se po rođenju. Prilikom ždrebljenja, samo deo skeleta novorođenog ždrebeta je već okoštao (9). Tokom ranog fetalnog razvoja, primarni kostur ploda čini hrskavica, a potom dolazi do formiranja mesta gde će započeti proces osifikacije. Proces formiranja kosti nastaje u osteoidnom tkivu koje stvaraju koštane ćelije osteoblasti, iako se kost može formirati konverzijom hrskavice u koštano tkivo, procesom poznatim kao endohondralno okoštavanje (10). Abnormalnosti u formiranju koštanog tkiva i hrskavice, tj. u procesu endohondralnog okoštavanja mogu usloviti nastanak lezija (11). Poremećaj endohondralnog okoštavanja najčešće rezultira osteohondrozom (OC) (9).

Koštano tkivo sadrži tri vrste ćelija, osteoblaste, osteoklaste i osteocite (10). Osteoblasti stvaraju osnovnu materiju koštanog tkiva, osteoklasti razgrađuju koštanu materiju, a osteociti održavaju kost živim tkivom. Sve kosti sastoje se iz organskog i neorganskog dela, a upravo kolagen i proteoglikani, sintetizovani od strane osteoblasta, čine organski deo kosti. Neorganski deo čine prvenstveno kristali kalcijum-fosfata (11, 12).

Ćelije koje proizvode komponente matriksa hrskavice nazivaju se hondroblasti, a kasnije hondrociti, kada postaju okruženi matriksom (12). Tip hrskavice koja se nalazi u modelu fetusne kosti kao i u zglobovima naziva se hijalina hrskavica. Matriks hijaline hrskavice sačinjen je od kolagena (uglavnom tipa II) ugrađenog u proteoglikane (npr. agrekan) i glikoproteine (10, 12).

Tokom endohondralnog okoštavanja, hrskavično tkivo se postepeno zamenjuje koštanim tkivom (10). Okoštavanje počinje od primarnog centra okoštavanja, u samoj sredini hrskavične kosti, a zatim se nastavlja prema periferiji kosti, gde se razvijaju sekundarni centri za okoštavanje. Proces osifikacija završava se u distalnim delovima kostiju, a preostalo tkivo postaje zglobna hrskavica (11).

Zglob predstavlja spoj između dve ili više kostiju, u čijem sastavu se nalazi i sloj hijaline hrskavice koja pokriva zglobne koštane površine (10, 11). S obzirom da su hrskavice mekše od koštanog tkiva, njihova uloga je upravo u tome da smanji udar i trenje između kostiju. Međutim, one ne sadrže krvne sudove i nerve. Iz tog razloga, povrede hrskavice zarastaju sporo (11). Kako zglobna hrskavica nije inervisana, može se objasniti zašto zglobne lezije mogu uznapredovati značajno pre nego što pacijent postane svestan bola (13). Kapsula je sačinjena od gustog vezivnog tkiva i povezuje kosti u sinovijalni zglob, koji formira zglobnu šupljinu (10, 13). Sinovijalna membrana oblaže unutrašnju površinu kapsule i izlučuje viskoznu tečnost, tj. sinovijalnu tečnost, koja podmazuje zglob (10).

Bilo koje promene u anatomskom i fiziološkom svojstvu zglobova, usloviće razvoj oboljenja.

### **Bolesti kostiju i zglobova**

Kao posledica velikog fizičkog opterećenja i mehaničkog stresa, povrede zglobova konja predstavljaju čest problem (14). Kada je mehanički integritet tkiva ugrožen bolešću, velikim opterećenjima i treninzima, simptomi sa napredkom bolesti postaju uočljivi. Međutim, oboljenja često dugo protiču u subkliničkom obliku, iz tog razloga, značaj pomenutih analiza je veći.

Osteohondroza (OC) se u literaturi pominje kao oboljenje sa poremećajem ćelijske diferencijacije, osifikacije epifizne i zglobne hrskavice, razvojem hipertrofije i nekroze hrskavice (15, 16). Sa razvojem bolesti dolazi i do kliničke manifestacije oboljenja (16, 17). Javlja se kada okoštavanje ne sledi postepeni i redovni proces, a na pojedinim mestima rezultira nepravilnom osifikacijom sa zadebljanim hrskavicama. Osteohondroza predstavlja čest uzrok hromosti kod mladih konja, što dovodi do smanjenja atletskog potencijala (18). U pitanju je multifaktorijalna bolest, pri čemu značajni uzroci mogu biti: ishrana, stopa rasta, nasledni faktori i traume koji igraju važnu ulogu. Mladi konji sa brzim stopama rasta i faktorima koji dovode do brzog rasta, uključujući genetski potencijal i uticaj okoline, su predisponirani za razvoj OC. Osteohondroza sa pristunim slobodnim fragmentima u zglobnom prosturu naziva se osteohondritis dissecans (OCD) (19). OC se može razvijati samo dok je aktivan proces endohondralnog okoštavanja, dok se većina OCD lezija razvija pre devetog meseca starosti, mada će se mnoge lezije pojaviti i nestati spontano pre tog perioda. Pojedini marker se ispituju u cilju dijagnostike OC, kao i u predviđanju progresije i praćenje odgovora na lečenje (18, 19). Markeri takođe mogu biti važni i u procesu rasta i formiranja kostiju, tokom razvoja i treninga, kao i u identifikovanju abnormalnosti kostiju pre nego što prerastu u potencijalno teške povrede, poput preloma (17, 19).

Osteoarthritis (OA) može biti septičnog i aseptičnog karaktera, a prolazi u akutnom i hroničnom toku (20). Kod oboljenja dolazi do degeneracije hrskavice, gubitka komponenti matriksa, subhondralne skleroze kosti, formiranja osteofita, razvoja zapaljenja i fibroze periartikularnog tkiva. Smatra se da je trauma čest etiološki faktor u nastanku aseptičnog OA (16, 20, 21). To može biti pojedinačni traumatski događaj, koji vodi do povrede jednog ili više zglobnih struktura ili oštećenja usled višestrukih ponavljajućih traumatičnih povreda, prouzrokovanih svakodnevnim aktivnostima, uključujući treninge i

takmičenja (21). Septična forma nastaje usled bakterijske infekcije i karakteriše se neutrofilnom infiltracijom sinovijalne tečnosti, sa nekrozom sinovijalne membrane (16, 20, 21).

### **Biomarkeri**

Biohemijski i molekularni markeri predstavljaju direktne ili indirektne pokazatelje abnormalnih promena u koštanom tkivu (22). Molekuli koji su normalni produkti i nusprodukti metaboličkih procesa, koji se odvijaju unutar koštanog tkiva, često se koriste kao markeri (5, 21). Prilikom razvoja nekog oboljenja, koncentracija ovih markera može da se poveća ili smanji, jer se promene dešavaju u ravnoteži između anaboličkih i kataboličkih procesa unutar tkiva. Kod bolesti zglobova, kada su u pitanju zglobna hrskavica, meniskus, ligamenti ili sinovijalna membrana, ovi molekuli mogu biti prisutni u sinovijalnoj tečnosti (6). Obično se isti molekuli iz koštanog tkiva nađu u krvotoku. Sposobnost prepoznavanja i merenja markerskih molekula u sinovijalnoj tečnosti, serumu i urinu daje istraživačima i kliničarima mogućnost da ih koriste kao biomarkere bolesti zglobova (22). Prema načinu na koji se biomarkeri detektuju u tkivnim tečnostima, možemo ih podeliti na biohemijske i imunološke markere. Imunološki markeri predstavljaju najosetljiviji način identifikacije i kvantifikacije (5, 6, 22). Poliklonska i monoklonska antitela su proizvedena protiv različitih epitopa fragmenata molekula agregata i drugih, koji se oslobađaju od hrskavice. Epitopi su područja na površini antigenog molekula protiv kojih je imunološki odgovor usmeren. Kada se dobije antitelo na određeni epitop, količina epitopa može da se meri radioimunološkim testom ili ELISA testom (8, 23).

Osteokalcin predstavlja mali, nekolageni protein koji se uglavnom sintetiše od strane osteoblasta i za koji se veruje da je povezan sa mineralizacijom novoformiranog osteoida (7, 8). Osteokalcin je pretpostavljeni biomarker stvaranja i mineralizacije kostiju (8, 9, 10). Koncentracije osteokalcina u serumu pokazale su značajnu korelaciju sa težinom OC kod ždrebad tokom prve godine života. Ždrebece sa razvijenim OC su imale povećana serumsku koncentraciju osteokalcina. Merenje koncentracije osteokalcina tokom prvih nekoliko nedelja nakon ždrebljenja može imati potencijalnu vrednost za predviđanje rizika za razvoj OC (9, 10).

Matriks metaloproteinaze (MMP) imaju ključnu ulogu u homeostazi zglobnih hrskavica, tokom fizioloških i patoloških promena (10, 11). Smatra se da je poremećaj kolagene arhitekture uzrok hronične degenerativne bolesti kao što su OA. Kolagenaze su enzimi iz porodice MMP i mogu se cepati na netaknuti fibrilarni kolagen (24). Izuzetno visok MMP nivo primećen je u sinovijalnoj tečnosti fetalnih metakarpofalangealnih zglobova. Posle rođenja ovi nivoi su postepeno opadali, a pad se poklopio sa prestankom rasta i razvijanja (5, 24). U sinovijalnoj tečnosti OA metakarpofalangealnih zglobova kod starijih konja aktivnost MMP-1 bila je značajno veća nego u sinovijalnoj tečnosti združenih zdravih metakarpofalangealnih zglobova. Trening nije imao značajnog uticaja na aktivnost MMP-1. MMP-1 može biti korisno sredstvo u dijagnostičkoj, terapijskoj ili prognostičkoj medicini na konjima sa sumnjom na OA (5, 7, 24).

Alkalna fosfataza specifična za kosti (BAP) je izoforma alkalne fosfataze i igra važnu ulogu u stvaranju kostiju (4). U sinovijalnoj tečnosti zahvaćenih zglobova, kod aktivnog OA, koncentracije BAP su povećane u poređenju s normalnim zglobovima (5, 9, 24). Pozitivna korelacija između BAP u sinovijalnoj tečnosti i oštećenja zglobnih hrskavica pokazala je vezu između promena na koštanom i zglobnom tkivu kod OA. Korelacija između oštećenja hrskavice i nivoa markera potvrđuje upotrebu sinovijalne tečnosti BAP u OA proceni. U serumu konja sa OC koncentracije BAP bile su značajno niže nego u serumu normalnih konja (4, 5, 9, 24). Sa druge strane, nivo BAP u sinovijalnoj tečnosti bio je značajno viši kod konja sa OC nego kod zdravih konja.

Karboksipeptid kolagena tipa II (CPII) je marker sinteze kolagena tipa II (4, 5, 8). Tokom svoje prve godine života, kod ždrebad sa OC izmereni su viši nivoi CPII u serumu, nego kod zdravih ždrebad. Izgleda da je CPII dosledan pokazatelj za razvoj OC (5, 24). Kod konja mlađih od 2 godine sa potvrđenim OCD izmereni su značajno viši nivoi CPII u sinovijalnoj tečnosti, u odnosu na one koji nisu pod uticajem starosti (5, 6, 24). Nisu zabeležene značajne korelacije između mladih i starih, zdravih konja. Druga studija pokazala je da je nivo CPII bio povećan i u sinovijalnoj tečnosti i u serumu, kod konja sa

osteohondralnom fragmentacijom, a takođe u sinovijalnoj tečnosti i serumu kod konja sa OC (5, 6, 25). Direktna veza između nivoa CPII i ozbiljnosti oboljenja je potvrđena (23). Degradacioni fragment, karboksi-terminalni telopeptid kolagena I (CTX I), takođe pokazuje povišene vrednosti u serumu obolelih konja (25).

Glikozaminoglikan (GAG) je biomarker proteoglikana hrskavice čiji se povećani nivo u serumu može uočiti u ranim fazama osteoartritisa, ali takođe i u fiziološkom odgovoru hrskavice na pojačanu fizičku aktivnost. Niži prosečni nivo GAG kod trkačkih konja, koji su zadobili povrede, u poređenju sa zdravim konjima, mogu ukazati na neuspešnu adaptaciju hrskavice na sve veće opterećenje u treningu (25).

Hondroitin sulfat sastavni je deo proteoglikana iz hrskavice. a CS-846 predstavlja hondroitin sulfatni epitop, koji se obično nalazi u fetalnoj i OA hrskavici i skoro da ga nema kod zdravih, zrelih zglobnih hrskavica (5, 6, 23). CS-846 postepeno nestaje iz hrskavice sa starenjem, ali se ponovo pojavljuje u zglobovima sa razvijenim OA (5, 23, 25). U poređenju sa zdravim konjima, konji sa osteohondralnom fragmentacijom imali su značajno veći nivo ovog epitoma, u sinovijalnoj tečnosti i serumu. U studiji na konjima sa indukovanom OA, CS-846 nivo u sinovijalnoj tečnosti značajno je viši u poređenju sa kontrolnom grupom konja (6, 7, 8, 23). Čini se da je CS-846 veoma koristan za rano otkrivanje i identifikovanje normalnog i OA zgloba. Upotreba kombinacije CS-846 i koncentracije CPII omogućila je tačnu klasifikaciju osteohondralnih promena u 79% slučajeva (4, 5, 7).

Interleukin 6 utiče na razvoj OA kod konja, proizvodnjom citokina u sinovijalnim membranama i osteohondralnim fragmentima (4, 5). U razvoju intraartikularnih lezija, upalni citokin interleukin-6 (IL-6) može biti od velike važnosti (4, 5, 6). Kod konja sa prisutnim frakturama kostiju, izmeren je značajno viši nivoi IL-6 u poređenju sa konjima bez preloma. Dramatično povećanje IL-6 u sinovijalnoj tečnosti ukazuje na prisustvo osteohondralne fragmentacije, iako niska ili nemerljiva koncentracija IL-6 ne isključuje prisustvo fraktura (5, 6, 23, 25).

Trening može imati uticaj na koncentraciju koštanih markera u serumu. Studija čistokrvnih dvogodišnjaka pokazala je da sportski konji imaju značajno nižu koncentraciju osteokalcina nego kontrolna grupa konja (25). Pošto su biohemijski markeri kosti direktna mera aktivnosti koštanih ćelija, ovaj nalaz ukazuje da su ćelije u kostima mladih konja, koji su u rastu, osetljive na promene njihovih uslova za život. Koncentracije u serumu i sinovijalnoj tečnosti markera CS846, CPII i osteokalcina značajno su veće kod konja zahvaćenih OA, u poređenju sa zdravim sportskim konjima (23, 25). Nedostatak treninga kod prevremeno rođene ždrebadu dovodi do poremećaja u sazrevanju kostiju, što se odražava na smanjenje koncentracije koštanih markera (23, 25). Rizik od povreda mišićno-koštanog sistema se može povećati odloženim metabolizmom kostiju. Rutinska analiza koštanih markera koji odražavaju koštani promet, očigledno su od koristi za praćenje koštanog metabolizma u uzgoju ždrebadu, u prvim mesecima života (5,7, 25).

U tabeli 1, prikazane su koncentracije biomarkera u serumu ispitivanih životinja, u istraživanju iz 2019. godine. U ovom istraživanju učestvovao je 61 konj, od kojih je 47 činilo kontrolnu grupu, a 14 grupu obolelih, prema kojima je napravljena srednja vrednost za biomarkere obolelih konja.

**Tabela 1.** Koncentracije biomarkera u serumu ispitivanih konja (Agnieszka J. Turlo i sar, 2019).

Biomarkeri	Kontrolne vrednosti	Srednje vrednosti kod obolelih
GAG (mcg/mL)	47.29 ± 4.83	42.16 ± 3.34
CS846 (ng/mL)	335.8 ± 126.8	270.6 ± 95.62
CPII (ng/mL)	3633 ± 590.0	3070 ± 706.7
OC (ng/mL)	59.53 ± 10.07	43.92 ± 5.734
CTX I (ng/mL)	0.4152 ± 0.13	0.6285 ± 0.08

### Uzorkovanje i analiza uzoraka

Uzorci krvi uzimaju se venepunkcijom vene jugularis, a zatim se izdvaja serum, centrifugovanjem pune krvi na 4380 g, tokom 5 minuta. Izdvojen serum, može se zalediti na temperaturi od -20°C. Analize uzoraka se vrše putem ELISA testova. Izmeren je nivo osteokalcina komercijalnim ELISA setovima u nerazređenim uzorcima seruma (25). Koncentracija glikozaminoglikana je analizirana sa dimetil-metilenplavim testom, u nerazređenim uzorcima posle digestije papainom. Hondroitin sulfat epitop i CPII mereni su pomoću komercijalnih ELISA testova, u uzorcima razblaženim 1: 5 i u razređenju 1: 4. Svi uzorci su analizirani u duplikatima i merenja su ponovljena ako je koeficijent varijacije unutar ispitivanja (CV) premašio 15% (23, 25).

### Zaključak

Ispitivanje biomarkera, sa ciljem praćenja razvoja skeleta, prevencije oboljenja i praćenja terapijskog protokola, predstavlja značajan korak u medicini, iz više razloga. Nedovoljno istražena oblast omogućava nam da sprovedemo detaljnija istraživanja i obezbedimo relevantnije podatke, u korist novih dostignuća u oblasti preventivne i dijagnostičke medicine.

### Literatura

1. McIlwraith, C. W. 2005a *Advanced techniques in the diagnosis of bone disease*. In: *Advances in equine nutrition III* (ed. J.D. Pagan), 373-381. Nottingham Univ. Press.
2. Nada Majkić-Singh, Svetlana Ignjatović, Radmila Kovačević, Milica Ilić, Nataša Lalić. 2002. *Dijagnostički i prognostički značaj biomarkera*. *Jugoslav. Med. Biohem.* 21: 1–7.
3. Nada Majkić-Singh, Svetlana Ignjatović. 2006. *Dijagnostički i prognostički značaj biomarkera*. *Jugoslav. Med. Biohem.* 25: 227–233.
4. McIlwraith, C. W. 2005b. *Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review*. *Equine Veterinary Journal* 37, 473-482.
5. McIlwraith, C. W., Kawcak, C. E., Frisbie, D. D., Little, C. B., Clegg, P. D., Peffers, M. J., Kraus, V. B. 2018. *Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis*. *Journal of Orthopaedic Research*.
6. Milić A, Đurić M, Gajić G, Mitrović M, Urošević LJ, Jovanović V, Kovačević R, Zeljković A, Ninić A, Spasojević- Kalimanovska S. 2017. *Značaj određivanja koštanih biomarkera u proceni rizika od fraktura i praćenju terapije kod pacijenata sa osteoporozom*. *Arh.farm.*;67: 196– 208
7. Johanna Berg-Johansson. 2009. *Biomarkers in equine bone and joint disorders*. *Animal Science – Bachelor degree project 15hp*
8. Frisbie, D. D., Al-Sobayil, F. A., Billingham, R. C., Kawcak, C. E., McIlwraith, C. W. 2008. *Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses*. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 1196-1204.
9. van Weeren, P. R. 2006. *Etiology, diagnosis and treatment of OC(D)*. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5, 248-258.
10. Sjaastad.V., Hove, K., Sand, O. 2003. *Physiology of Domestic Animals*, 58, 239-241,244. *Scandinavian Veterinary press, Oslo*.
11. Billingham, R. C., Brama, P. A. J., van Weeren, P. R., Knowlton, M. S., McIlwraith C. W. 2004. *Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals*. *American Journal of Veterinary Research* 65, 143-150.
12. Junqueira, L.C., Carneiro, J. 2005. *Basic Histology: text and atlas, 11th ed.*, 128-129. McGraw-Hill, USA.
13. Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. 2002. *Textbook of veterinary anatomy, 3rd ed.*, 18. Saunders, USA.
14. Riggs, C. M. 2006. *Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse*. *Equine Veterinary Education* 18, 100-112.
15. Donabedian, M., van Weeren, P.R., Perona, G., Fleurance, G., Robert, C., Leger, S., Bergero, D., Lepage, O., Martin-Rosset, W. 2008. *Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse*. *Equine Veterinary Journal* 40, 253-259
16. Chiaradia, E., Pepe, M., Tartaglia, M., Scopetta, F., D'Ambrosio, C., Renzone, G., ... Scaloni, A. 2012. *Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics*. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4478–4493.

17. Van Weeren, P. R., & Olstad, K. 2015. Pathogenesis of osteochondrosis dissecans: How does this translate to management of the clinical case? *Equine Veterinary Education*, 28(3), 155–166.
18. Clarke, K. L., Reardon, R., & Russell, T. 2014. Treatment of Osteochondrosis Dissecans in the Stifle and Tarsus of Juvenile Thoroughbred Horses. *Veterinary Surgery*, 44(3), 297–303.
19. Naccache, F., Metzger, J., & Distl, O. 2018. Genetic risk factors for osteochondrosis in various horse breeds. *Equine Veterinary Journal*, 50(5), 556–563.
20. Reesink, H. L., Watts, A. E., Mohammed, H. O., Jay, G. D., & Nixon, A. J. 2017. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(1), 128–137.
21. Lasarzik, J., Bondzio, A., Rettig, M., Estrada, R., Klaus, C., Ehrle, A., ... Lischer, C. J. 2018. Evaluation of Two Protocols Using Autologous Conditioned Serum for Intra-articular Therapy of Equine Osteoarthritis—A Pilot Study Monitoring Cytokines and Cartilage-Specific Biomarkers. *Journal of Equine Veterinary Science*, 60, 35–42.
22. Mendoza, L., Franck, T., Lejeune, J.-P., Caudron, I., Detilleux, J., Deliège, B., & Serteyn, D. 2018. Is Sclerostin Glycoprotein a Suitable Biomarker for Equine Osteochondrosis? *Journal of Equine Veterinary Science*, 64, 27–33.
23. Lecchi, C., Dalla Costa, E., Lebelt, D., Ferrante, V., Canali, E., Ceciliani, F., ... Minero, M. 2017. Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers to monitor acute pain associated with laminitis in horses. *Animal*, 12(02), 366–375.
24. Byron, C. R., Orth, M. W., Venta, P. J., Lloyd, J. W., & Caron, J. P. 2003. Influence of glucosamine on matrix metalloproteinase expression and activity in lipopolysaccharide-stimulated equine chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 64(6), 666–671.
25. Agnieszka J. Turlo<sup>1,2</sup>, Anna Cywinska<sup>1</sup> and David D. Frisbie. 2019. Revisiting predictive biomarkers of musculoskeletal injury in thoroughbred racehorses: longitudinal study in polish population. Turlo et al. *BMC Veterinary Research* 15:66.

## **HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA I JEDINJENJA SA ANTIHELMINTIČKIM POTENCIJALOM**

Filip Štrbac<sup>1\*</sup>, Dragica Stojanović<sup>1</sup>, Radomir Ratajac<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

<sup>2</sup>Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

\*Autor za kontakt: [strbac.filip@gmail.com](mailto:strbac.filip@gmail.com)

### **Sažetak**

Neracionalna upotreba komercijalnih antihelmintika je dovela do razvoja antihelmintičke rezistencije kod mnogih vrsta endoparazita domaćih životinja. Zbog toga se intenzivno istražuju potencijalne alternative, među kojima često i etarska ulja različitih biljaka. Etarska ulja predstavljaju sekundarne metabolite biljaka sa veoma složenim hemijskim sastavom koji najčešće obuhvata veliki broj jedinjenja različitih hemijskih grupa. Najčešće su u pitanju različita terpeniska, terpenoidna ili fenilpropanoidna jedinjenja od kojih je veliki broj i identifikovan, pri čemu je važno napomenuti da hemijski sastav etarskih ulja može da varira u zavisnosti od mnogo endogenih i egzogenih faktora. Poznata su mnogobrojna lekovita svojstva etarskih ulja, među kojima i antimikrobno, antiinflamatorno, antioksidativno dejstvo, zbog čega su ovi biljni proizvodi svoju primenu našli u terapiji mnogobrojnih oboljenja. U različitim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima je kod mnogih etarskih ulja dokazan i antihelmintički potencijal, a koji potiče od različitih jedinjenja koja ulaze u njihov sastav. Među ovim sastojcima se posebno ističu karvakrol, timol, anetol, cinamaldehyd, karvon, limonen, pinen, terpinen, kariofilen, cimen, linalool, geraniol, mentol, borneol, citral, kamfor, eukaliptol, eugenol i mnogi drugi. Njihov izolovani antihelmintički potencijal je takođe potvrđen u mnogim istraživanjima, a ispitane su i njihove različite sinergističke kombinacije. Prisustvo velikog broja jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja pored efikasnosti govori u prilog i manjoj mogućnosti razvoja rezistencije kod samih parazita, a s obzirom da su u pitanju prirodni preparati, i manjoj toksičnosti za životinje u poređenju sa sintetskim preparatima. Zbog toga etarska ulja i njihovi sastojci predstavljaju obećavajuću alternativu u rešenju problema antihelmintičke rezistencije.

Ključne reči: etarska ulja, jedinjenja, antihelmintici, efikasnost, rezistencija

### **Abstract**

The irrational use of commercial anthelmintics has led to the development of anthelmintic resistance in many species of domestic animals endoparasites. Therefore, potential alternatives, such as the essential oils of various plants, are being intensively explored. Essential oils are secondary metabolites of plants with a very complex chemical composition that usually includes a large number of compounds of different chemical groups. These are usually various terpene, terpenoid or phenylpropanoid compounds, many of which have been identified, whereby it is important to note that the chemical composition of essential oils can vary depending on many endogenous and exogenous factors. There are numerous documented medicinal attributes of essential oils, including antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects, which is why these herbal products have found their application in the treatment of many diseases. In various *in vitro* and *in vivo* examinations, essential oils have been shown to have anthelmintic potential, which originates from various compounds that are part of their chemical composition. Among these ingredients, carvacrol, thymol, anethole, cinnamaldehyde, limonene, pinene, terpinene, caryophyllene, cymene, linalool, geraniol, menthol, borneol, citral, camphor, eucalyptol, eugenol and many others stand out. Their isolated anthelmintic potential has also been confirmed in many studies, and their various synergistic combinations have been investigated. In addition to an increase in efficiency, the presence of a large number of compounds with different mechanisms of action can contribute also to less possibility of the development of resistant helminth strains. Also, the natural origin



of essential oils can contribute to their less toxicity to animals compared to synthetic preparations. Therefore, it can be concluded that essential oils and their ingredients represent a promising alternative in combating anthelmintic resistance.

Keywords: essential oils, compounds, anthelmintics, efficiency, resistance

### Uvod

Antihelmintička rezistencija kod helminata domaćih životinja se javila kao posledica neracionalne primene komercijalnih preparata u smislu preučestalih tretmana, hiperdoziranja ili subdoziranja lekova koji se koriste u praksi. To je dovelo do smanjene efikasnosti lekova iz grupa benzimidazola, makrocikličnih laktona i imidazotiazola i velikih ekonomskih gubitaka prouzrokovanih različitim helmintima (1,2,3). Zbog toga se danas aktivno traga za novim aktivnim principima, među kojima se sve više ispituju različiti prirodni preparati biljnog porekla kao što su etarska ulja (4,5).

Etarska (esencijalna) ulja predstavljaju kompleksnu mešavinu različitih organskih supstanci čija uloga u samim biljakama još uvek nije dovoljno razjašnjena (6,7). Kao sekundarni metaboliti biljaka jakog i karakterističnog mirisa, etarska ulja se smatraju nekom vrstom biljnih hormona ili tečnom manifestacijom imunog sistema biljaka čija je uloga je prevashodno zaštita od različitih štetoina i predatora, dok sa druge strane privlače različite vrste insekata i ptica kao oprašivače (6). Ove isparljive supstance se sintetišu u različitim delovima biljaka, najčešće u listovima i cvetovima, ali i u rizomima, semenima, plodovima, korenu i stablu (8). Zbog svojih osobina, etarska ulja se koriste u kozmetičkoj industriji, industriji hrane, ali i za terapiju različitih oboljenja što je poznato kao aromaterapija (2,8).

U dosadašnjim istraživanjima su dokazana brojna lekovita svojstva različitih etarskih ulja kao što antimikrobno, antiinflamatorno, antioksidativno i mnoga druga dejstva (8,9). U pojedinim ispitivanjima je dokazan i antihelmintički efekat pojedinih etarskih ulja protiv različitih helminata od značaja za veterinarsku medicinu. Pri svemu tome je važno napomenuti da je za navedena svojstva etarskih ulja zaslužan njihov bogat hemijski sastav. Zbog toga je cilj ovog rada prikaz hemijskog sastava etarskih ulja i ukazivanje na značaj pojedinih sastojaka sa antihelmintičkim potencijalom, što je bitno kako za razumevanje mehanizma dejstva etarskih ulja, tako i za njihovu selekciju za buduća antihelmintička i druga ispitivanja.

### Hemijski sastav etarskih ulja i faktori koji na njega utiču

Hemijski sastav etarskih ulja je izuzetno složen s obzirom na veliki broj jedinjenja koja pripadaju različitim hemijskim grupama. Zbog toga je i teško napraviti tačnu klasifikaciju sastojaka etarskih ulja, kao i njihovu generalnu podelu. Prema Butnariu i Sarac (2018), etarska ulja zapravo predstavljaju kompleksnu mešavinu velikog broja sastojaka čiji broj je različit, ali u pojedinim slučajevima može da se kreće i do nekoliko stotina. Među njima dominiraju monoterpeni i seskviterpeni, ali takođe sadrže i aromatična jedinjenja, među kojima najčešće derivate fenilpropena (6). Slično tvrde i Fokou i sar. (2020), koji navode da su terpenoidna i fenilpropanoidna jedinjenja glavne komponente etarskih ulja (7). Morsy (2016) deli sastojke etarskih ulja u četiri glavne grupe: 1. terpeni (osnovu predstavljaju izoprenske jedinice); 2. jedinjenja ravnog lanca koja ne sadrže nijedan bočni lanac; 3. fenilpropanoidi (derivati benzena) i 4. ostala jedinjenja koja se ne mogu svrstati ni u jednu od prethodne tri (npr. jedinjenja koja sadrže sulfurne i azotne grupe). Isti autori dalje deli same terpene na ugljovodonične terpene i njihove oksigenisane derivate koji zapravo predstavljaju terpenoide i mogu se dalje podeliti na alkohole, fenole, aldehide, ketone, estre, etre i epokside (10). Sa ovakvom podelom terpenkih jedinjenja se slažu i Butnariu i Sarac (2018) (6).

Da ne bi došlo do zabune, potrebno je napraviti razliku između terpena i terpenoida. Terpeni predstavljaju ugljovodonike koji nastaju kombinacijom nekoliko izoprenskih jedinica, na osnovu čijeg broja se mogu dalje klasifikovati. Pri tome, kombinacija od dve izoprenske jedinice čini osnovnu jedinicu

terpena, pa tako pomenuti monoterpeni sadrže dve, dok seskviterpeni sadrže tri izoprenske jedinice (10). Sa druge strane, terpenoidi zapravo predstavljaju terpene kod kojih su metil grupe uklonjene ili pomerene, ili su dodati atomi kiseonika pa se kao rezultati dobijaju pomenuti oksigenisani (kiseonični) derivati. Kao i terpeni, i terpenoidi se takođe mogu podeliti na monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide itd (10,11,12). Važno je napomenuti da neki autori koriste termin terpen u širem smislu, podrazumevajuće time i terpenoide. Sa druge strane, fenilpropanoidi predstavljaju najznačajniju ne-terpensku grupu jedinjenja etarskih ulja koja obuhvata sastojke derivate n-propil benzena od kojih neki imaju visok farmakološki potencijal (10). Ipak, može se reći da terpeni i terpenoidi predstavljaju najbrojniju grupu sastojaka etarskih ulja, dok su fenilpropanoidi i ostala jedinjenja zastupljena u manjem procentu (2,10).

Veliki broj sastojaka etarskih ulja je izolovan i identifikovan. Za mnoge od njih su otkrivne brojne farmakološke aktivnosti, između ostalih i antihelmintičke. Neki od najpoznatijih sastojaka etarskih ulja su (2,7,8,10,13):

- Ugljovodonični terpeni – limonen,  $\alpha$  i  $\beta$ -pinen, kamfen,  $\alpha$  i  $\gamma$ -terpinen, sabinen, mircen,  $\beta$ -kariofilen, germakren B i D,  $\alpha$  i  $\beta$ -selinen, farnesen, o i p-cimen i dr.;
- Oksidisani derivati (terpenoidi)
  - a) Fenoli – timol, karvakrol;
  - b) Alkoholi - linalool, citronelol, geraniol, mentol, farnesol, bisabolol,  $\alpha$ -terpineol terpinen-4-ol, borneol, nerolidol;
  - c) Aldehidi – citral, citronelal, sinensal;
  - d) Ketoni –  $\alpha$  i  $\beta$ -tujon, kamfor (2-bornanon), fenhon, menton, karvon;
  - e) Oksidi – eukaliptol (1,8-cineol);
  - f) Estri – linalil acetat, geraniol acetat, kedril acetat;
- Fenilpropanoidi - anetol, eugenol, estragol, dilapiol, vanilin, cinamaldehyd, miristicin.

Hemijski sastav etarskih ulja zavisi i može se menjati pod uticajem mnogo faktora. Njihov sastav se razlikuje od jedne taksonomske grupe biljaka do druge, tako da pre svega zavisi od biljne vrste od koje se ekstrahuje. Međutim, hemijski sastav se može razlikovati od biljke do biljke unutar same vrste, čak i unutar same biljke u zavisnosti iz kog dela se uzima. Generalno, faktori koji utiču na hemijski profil etarskih ulja se mogu podeliti na abiotske i biotske faktore. Abiotski faktori podrazumevaju sve nežive faktore koji utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita, kao što je količina vode u zemljištu, pH i salinitet zemljišta, kao i klima i mikroklima staništa u kome biljka raste. Biotički faktori podrazumevaju žive organizme koje utiču na same biljke uključujući različite mikroorganizme u zemlji, kao i organizme koje žive u ekosistemu u kome se gaji biljka. Naime, sastav i količina sekundarnih metabolita biljaka je jednim delom specifičan za samu biljku, dok drugim delom varira pod uticajem spoljašnje sredine, što pre svega zavisi od prisustva predatora protiv kojih se biljka brani, zatim prisustva insekata koje biljka privlači zbog oprašivanja, kao i različitih drugih organizama sa kojima biljka stupa u simbiozu (7).

Sa druge strane, Barra (2009) faktore koji utiču na hemijsku varijabilnost etarskih ulja deli na egzogene i endogene. Egzogeni faktori su pre svega vezani za okruženje biljke i uključuju količinu svetlosti, padavine, nadmorsku visinu na kojoj biljka raste, kao i već pomenute osobine zemljišta. U ovom slučaju se u egzogene faktore ubraja i godišnje doba odnosno sezona kada se vrši berba biljaka i sa tim prateće faktore (npr. temperatura), zbog čega se intenzivno vrše istraživanja u cilju pronalaska idealnog perioda godine sakupljanja pojedinih biljaka kada će etarska ulja dobijena od njih imati najbogatiji sastav. Endogeni faktori su povezani sa samim biljkama i uključuju mesto proizvodnje i akumulacije etarskih ulja u samim biljkama, starost biljke kao i genetske karakteristike koji regulišu sekundarni metabolizam (14). Sličnu podelu nude i Dhifi i sar. (2016), koji su faktore koji utiču na hemijski sastav etarskih ulja podelili na unutrašnje koji su vezani za biljku, i spoljašnje, koji su vezani za okruženje (8). U svakom slučaju, sve navedene faktore treba imati u vidu prilikom sakupljanja biljaka i ekstrakovanja etarskih ulja.

Sastav etarskih ulja zavisi i od procedura koja se sprovede pre same ekstrakcije, način ekstrakcije, kao i čuvanja etarskih ulja nakon ekstrakcije. Tako su, na primer, neka dosadašnja istraživanja pokazala da sušenje biljnog materijala pre ekstrakcije može dovesti do bogatijeg hemijskog sastava etarskih ulja. Metoda ekstrakcije kao što su parna ekstrakcija, ekstrakcija rastvaračem, superkritična fluidna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, hidrodestilacija itd., takođe u manjoj ili većoj utiče na hemijskih sastav etarskih ulja. Na kraju, etarska ulja su veoma osetljiva, zbog čega ih treba pažljivo čuvati nakon ekstrakcije kako bi zadržala svoje osobine. Naime, većina sastojaka etarskih ulja su nezasićena (sadrži dvostruke veze), zbog čega su osetljiva na svetlost (fotosenzibilna) i kiseonik (oksidirajuća), pa bi etarska ulja trebalo čuvati u odgovarajućem okruženju kako bi zadržala svoj hemijski sastav i samim tim farmakološke osobine (7).

### Sastojci etarskih ulja sa antihelmintičkim potencijalom

Za veliki broj sastojaka etarskih ulja je ispitana i dokazana antihelmintička efikasnost. U nekim ispitivanjima je direktno ispitivan efekat pojedinih jedinjenja, dok je u drugim ispitivanjima indirektno pokazano njihovo dejstvo putem ispitivanja samih etarskih ulja. André i sar. (2016) su ispitivali antihelmintički efekat karvakrola i njegovog acetilovanog derivata karvakrol-acetata (CA) protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Pri tome su korišćeni *in vitro* testovi, tzv. *egg hatch test* (EHT), *larval development test* (LDT) i *adult worm motility test* (AWMT), kao i *in vivo* test, *faecal egg count reduction test* (FECRT). Rezultati su pokazali visoku *in vitro* efikasnost oba jedinjenja ( $EC_{50}$  vrednosti 0,17 i 1,7 kod EHT,  $LC_{50}$  vrednosti 0,2 i 0,3 mg/mL kod LDT za karvakrol i CA, redom, visoka inhibicija pokretljivosti adulta kod AWMT), kao i solidnu *in vivo* efikasnost karvakrol-acetata (35,4% i 65,9% redukcija broja jaja 8 i 16 dana nakon tretmana, redom) (15). U sličnom istraživanju, André i sar. (2017) su ispitivali i efekat timola i timol-acetata (TA) protiv pomenutih parazita, gde je takođe dokazana visoka *in vitro* efikasnost ( $EC_{50}$  vrednosti 0,08 i 1,9,  $LC_{50}$  vrednosti 1,0 i 0,8 mg/mL za timol i TA, redom, visoka inhibicija pokretljivosti adulta kod AWMT) i solidna, ali nešto manja *in vivo* efikasnost u poređenju sa prethodnim istraživanjem (redukcija broja jaja od 25,5% i 59,8%, 7 i 14 dana nakon tretmana timolom, redom) (16). Pri svemu tome, u ovim istraživanjima je dokazana manja toksičnost acetilovanih derivata u odnosu na sam karvakrol i timol kod miševa, što se objašnjava zamenom hidroksilnih radikala sa acetilnim radikalom kod ovih jedinjenja. To ukazuje da acetilovanje može dodatno smanjiti toksičnost i neželjene efekte karvakrola i timola prilikom eventualne primene kod samih ovaca (15,16).

Visoku antihelmintičku aktivnost pomenutih fenola i njihovih acetilovanih derivata André i sar. objašnjavaju na nekoliko načina. Višestruke efekte timola i karvakrola povezuju sa njihovim mogućim interakcijama sa SER-2 tiraminskim receptorima koji kod nematoda regulišu brojne procese uključujući i aktivnost ždrela, lokomociju i polaganje jaja, a pri tome su ovi receptori prisutni u svim fazama životnog ciklusa nematoda. Inhibiciju polaganja jaja pomenuti autori objašnjavaju i mogućim strukturnih promena spoljašnjih reproduktivnih organa ženki. Takođe, inhibiciju pokretljivosti adultnih oblika autori povezuju i sa stvaranjem mehurića u kutikuli nematoda, delujući pri tome na organizaciju i elektrostatička svojstva površine membrane, čime menjaju njenu propustljivost i inhibišu aktivnost membranskih proteina kao što su ATP-aze. Sa druge strane, niska molekulaska težina ovih jedinjenja im omogućava lakšu penetraciju u helminte putem transkutikularne difuzije, omogućavajući im time njihovo dejstvo. Dalje, kutikularne promene izazvane karvakrolom i moguća neurotoksičnost mogu ometati propustljivost kutikule i pokretljivost, ometajući održavanje homeostaze kod ovih parazita. Nešto bolju efikasnost karvakrola u poređenju sa timolom pri tome objašnjavaju prodorom same kutikule nematoda i izazivanjem ultrastrukturnih lezija (15,16).

*In vitro* efikasnost timola je dokazana i protiv cestode *E. granulosus*, pri čemu je utvrđeno dejstvo na protoskolekse. Maksimalan protoskolecidni efekat je pri tome zabeležen pri koncentraciji timola od 10 µg/mL sa smanjenjem vijabilnosti protoskoleksa na 53,5% 12 dana nakon inkubacije, odnosno na 11,5% 42 dana nakon inkubacije. Protoskolecidni efekat se pri tome povezao sa oštećenjima tegumenta povezanih sa morfološkim promenama kao što su formiranje mehurića, gubitak kuka, uništavanje mikrotriha, kontrakcija pojedinih regiona itd (17). Takođe, ispitana je i dokazana dozno i vremenski zavisna cestocidna aktivnost timola protiv adultnih oblika i tetratiridijuma *Mesocestoides corti*, pri čemu

je timol prouzrokovao ozbiljna oštećenja na strukturnom i ultrastrukturnom nivou, kao i promene u pokretljivosti, a oštećenja su bila veća kod potpuno segmentiranih crva (18).

Katiki i sar. (2017) su ispitivali ovicidno dejstvo 10 različitih sastojaka etarskih ulja i njihovih različitih binarnih, tercijarnih i kvaternernih kombinacija u jednakoj srazmeri protiv *H. contortus*. Njihova komparativna efikasnost izražena u letalnim koncentracijama koje prouzrokuju smrtnost 50% jaja je bila sledeća: cinamaldehyd 0,018; anetol 0,070; karvon 0,085; karvakrol 0,11; timol 0,13; linalool 0,29; eugenol 0,57; vanilin 0,57; cineol 4,74 i limonen 207,56. Kada su u pitanju njihove kombinacije, kombinacionim indeksom (CI) su utvrđene sledeće kategorije: jak sinergizam, sinergizam, aditivni efekat, antagonizam i jak antagonizam, pri čemu je cilj kombinacija bio da njihov zajednički efekat bude veći od pojedinačnih efekata jedinjenja koje ulaze u njihov sastav. Tako su se, na primer, među binarnim najbolje pokazale sinergističke kombinacije cinamaldehyd:karvakrol i anetol:karvon sa  $EC_{50}$  vrednostima od 0,012 odnosno 0,013, među tercijarnim cinamaldehyd + karvon + karvakrol sa  $EC_{50}$  od 0,050, za koju je utvrđen aditivni efekat, dok je među kvaternernim najbolji rezultat dala sinergistička kombinacija (anetol + karvon) + (cinamaldehyd + karvon) sa  $EC_{50}$  od 0,02 (19).

Rezultati pomenutog istraživanja Katiki i sar. (2017) se mogu objasniti na sledeći način: kada su u pitanju pojedinačni sastojci, najbolji efekat su pokazali fenilpropanoidi cinamaldehyd i anetol. Ova dva jedinjenja su veoma slična u strukturi, ali je cinamaldehyd rastvorljiv u vodi dok anetol nije. Pomenuti autori objašnjavaju da je ova osobina razlog većeg *in vitro* efekta cinamaladehida, dok bi pri *in vivo* testiranju anetol mogao imati bolji efekat, s obzirom da njegova nepolarna priroda može favorizovati njegovu interakciju sa ćelijskom membranom parazita. To ukazuje na činjenicu da su pored hemijske strukture sastojaka etarskih ulja za efekat bitne i njihove osobine. Veoma visoka efikasnost kombinacije cinamaldehyd:karvakrol se može objasniti povećanjem propustljivosti citoplazmatske membrane od strane karvakrola omogućavaju time cinamaldehydu da se bolje transportuje u ćeliju (19). Drugo moguće objašnjenje jeste vezivanje cinamaladehida za proteine ćelijske membrane, čime se povećava broj, veličina i trajanje postojanja pora a samim tim i bolji transport ovih jedinjenja u ćeliju (20). Međutim, to je dokazano u ispitivanju efekate ove kombinacije protiv salmonela, pa je pitanje koliko se rezultati dobijeni za efekat na bakterijsku ćeliju mogu primeniti i u ovom slučaju. Sa druge strane, kombinacija anetol:karvon je jedna od retkih za koju je ispitan i dokazan i *in vivo* efekat, s obzirom da je njena primena u vidu inkapsuliranih formi dovela do značajnog smanjenja broja parazitskih jaja kod jaganjaca. Ovaj efekat se pri tome objasnio uticajem na smanjenje veličine mužjaka parazita i fertiliteta ženki (21). Tercijarne i kvaternerne kombinacije u istraživanju Katiki i sar. (2017) su pokazale manju efikasnost od binarnih, pri čemu smanjenu antihelminitičku aktivnost u ovom slučaju pomenuti autori objašnjavaju razblaživanjem aktivnih komponenti ovih kombinacija ili antagonizmom (19). Međutim, mehanizmi antagonizma u ovom slučaju nisu dovoljno poznati.

Različite kombinacije navedenih sastojaka su ispitivane i u drugim istraživanjima. Tako su Barbieri i sar. (2014) ispitivali ovicidni efekat različitih kombinacija cinamaladehida, karvona, karvakrola i anetola protiv *H. contortus*, pri čemu se najefikasnijom pokazala kombinacija cinamaladehida (25%) + karvakrola (50%) + anetol (25%) sa izračunatom  $EC_{50}$  vrednošću od 0,02 mg/mL (22). To pokazuje da je za krajnji efekat ovakvih kombinacija bitna i srazmera pojedinih komponenti. U svakom slučaju, navedena istraživanja su pokazala da se kombinovanjem određenih aktivnih sastojaka etarskih ulja može povećati antihelminitička efikasnost i eventualno smanjiti doza što može biti značajno kako se finansijskog aspekta, tako i sa aspekta smanjenja toksičnosti i neželjenih efekata ovih jedinjenja kod samih životinja u budućim *in vivo* ispitivanjima.

Pomenuti cinamaldehyd je najznačajniji sastojak etarskog ulja i drugih proizvoda cimeta (*Cinnamomum verum*), koji je u istraživanju Williams i sar. (2015) pokazao visoku *in vitro* efikasnost protiv *A. suum* nematode svinja. U ovom slučaju, ekstrakt kore cimeta čiji je glavni sastojak bio trans-cinamaldehyd, je pokazao aktivnost protiv  $L_3$  stadijuma larvi tako što je inkubacija ovog stadijuma preko noći u ekstraktu cimeta u koncentracijama između 0,125-1 mg/mL rezultovala 100% inhibicijom migracije larvi. Dodatno, pri koncentracijama većim od 0,250 mg/mL ekstrakta cimeta, sve larve su uginule u roku od 2-3 sata od početka inkubacije. Ovaj rezultat je potvrđen i u drugom eksperimentu sa  $L_4$  stadijumom larvi, kada je ponovo došlo do smrtnosti larvi u roku od nekoliko sati od početka inkubacije.

U daljem toku istraživanja, autori su testirali čist trans-cinamaldehyd protiv L<sub>3</sub> stadijuma *T. suis* i L<sub>1</sub> stadijuma *O. dentatum*, pri čemu su dokazali potentnu aktivnost ovog sastojaka takođe i protiv larvi ovih vrsta parazita. Time je dokazan visok antihelmintički potencijal cinamaldehyda protiv različitih gastrointestinalnih nematoda svinja (23). U drugim ispitivanjima je dokazan efekat cinamaldehyd i protiv nekih drugih nematoda, kao što je parazit riba *D. intermedius* (24).

Anetol je glavni sastojak etarskog ulja biljke *Croton zehneri*, aromatične biljke karakteristične za severoistok Brazila čiji antihelmintičke efekat je dokazan u istraživanju Camurça-Vasconcelos (2007). U ovom slučaju se ispitivao uticaj ovog etarskog ulja sakupljenog u dva navrata (C1 i C2) protiv *H. contortus*, pri čemu je u oba navrata glavni sastojak bio anetol sa procentualnom zastupljenošću od 39,34% odnosno 63,88%. Ispitivano etarsko ulje je pokazalo visoku antihelmintički potencijal sa EC<sub>50</sub> vrednošću u EHT testu od 0,55 (C1) i 0,74 (C2) mg/mL, odnosno LC<sub>50</sub> vrednošću u LHT testu od 1,17 (C1) i 1,37 (C2). Ispitana je i primena čistog anetola, koji je takođe pokazao solidnu, ali nešto manju efikasnost sa EC<sub>50</sub> od 0,69 i LC<sub>50</sub> vrednošću od 2,11 mg/mL u poređenju sa celim etarskih uljem. Poređenja radi, u istom ispitivanju je ispitan i dokazan efekat i etarskog ulja *Lipia sidoides*, sa glavnim sastojkom timolom (59,65%), koji je kao čist primenjen pokazao bolji larvicidni efekat od celog etarskog ulja (25). Za razliku od toga, u istraživanju Ferreira i sar. (2016), gde se ispitivao efekat primene etarskog ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i njegovog glavnog sastojka (50,22%) timola, etarsko ulje je pokazalo nešto veći i ovicidni i larvicidni efekat u poređenju sa timolom (2). Ipak, iz ovih istraživanja se može zaključiti da je među velikim brojem sastojaka etarskih ulja moguć sinergizam, ali i antagonizam, zbog čega antihelmintički efekat etarskog ulja zapravo u najvećoj meri zavisi od njegovog glavnog sastojka, što potvrđuju i André i sar. (2018) (5).

Glavni sastojci etarskih ulja koja su pokazala *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca u različitim istraživanjima su bili eugenol (*Ocimum gratissimum*), limonen (*Citrus sinensis*), mentol (*Mentha piperita*), geraniol (*Cymbopogon martinii* i *Cymbopogon schoenanthus*), eukaliptol (*Artemisia lancea*, *Piper aduncum* i *Rosmarinus officinalis*), linalool (*Arisaema franchetianum*), borneol (*Zanthoxylum simulans*), citral (*Cymbopogon citratus*), terpinen-4-ol (*Melaleuca alternifolia*),  $\alpha$ -pinen (*Juniperus communis*) itd, sugerišući da su ovi sastojci etarskih ulja zaslužni za njihovo antihelmintičko dejstvo (3,5,26). Limonen je bio glavni sastojak (28,82%) i etarskog ulja *Eucalyptus staigeriana* koji je pokazao visoku *in vitro* (EC<sub>50</sub> kod EHT od 0,324 i LC<sub>50</sub> kod LDT od 1,702 mg/mL), ali i *in vivo* efikasnost (76,57% redukcija broja jaja u fecesu 15 dana nakon tretmana) protiv gastrointestinalnih nematoda koza (27). Sa druge strane, najbolji efekat protiv gastrointestinalnih nematoda kod goveda su pokazala esencijalna ulja *C. citratus* i *C. martini*, sugerišući na značaj citrala i geraniola protiv ovih vrsta parazita kod goveda (28). Esencijalno ulje *C. citratus* i sam citral su pokazali dejstvo i protiv velikog metilja ovaca (*Fasciola hepatica*) inhibišući njegovu pokretljivost pri svim testiranim koncentracijama, pri čemu je efekat povezan sa gubitkom jednog dela integumenta kod metilja (29). Sličan efekat na pokretljivost i strukturne promene kod velikog metilja pokazali su i eugenol, timol i karvakrol (30).

Na kraju, pomenuti sastojci su identifikovani i u našim istraživanjima, gde je putem tzv. *egg hatch test*-a ispitivan ovicidni efekat različitih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Kao glavni sastojak etarskih ulja koja su se pokazala najefikasnijim su bili upravo karvakrol, timol, anetol, kao i p-cimen. Važno je pri tome naglasiti ulogu karvakrola, koji je praktično kod svih najefikasnijih ulja ili bio glavni sastojak, ili je bio jedan od glavnih sastojaka. U drugim slučajevima kod ulja koja su se takođe pokazala efikasnim, kao glavni sastojak identifikovani su  $\alpha$  i  $\beta$ -pinen, eukaliptol i piperiton. Sa druge strane, od ostalih jedinjenja identifikovanih u ovim istraživanjima, značajni su bili i  $\gamma$ -terpinen,  $\beta$ -kariofilen, kamfor, borneol,  $\alpha$ -terpinen,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalool, limonen i drugi. Zanimljiv rezultat ovih istraživanja je bio i to što je ukupan broj identifikovanih jedinjenja kod ulja često bio obrnuto proporcionalan pokazanim ovicidnim efektom prilikom međusobnog poređenja ovih ulja. Takođe, u ispitivanju dva hemotipa etarskog ulja hajdučke trave (*Achillea millefolium*) koja su nabavljena sa dva različita mesta (planine Radan i Golija), GC-MS analize su pokazale izvesne razlike u hemijskom sastavu između ovih hemotipova što je dovelo i do nešto drugačijeg ovicidnog efekta, sugerišući time na varijabilnost hemijskog sastava u zavisnosti od hemotipova i geografskog područja. U jednom slučaju je

ispitana i kombinacija odnosno smeša pojedinih sastojaka, konkretno linalool i estragol, koja je sa EC<sub>50</sub> od 0,98 pokazala značajan ovoidni efekat (Štrbac i sar., neobjavljeno).

### Zaključak

Etarska ulja i njihovi sastojci su u različitim istraživanjima pokazali efikasnost protiv različitih nematoda, trematoda i cestoda domaćih životinja, za šta je zaslužan njihov bogat hemijski sastav. Pri tome bi, između ostalih, posebnu pažnju trebalo obratiti na karvakrol, timol, anetol, cinamaldehyd, p-cimen, citral, geraniol, eukaliptol, mentol, linalool, kamfor, karvon, limonen a trebalo bi imati u vidu i mogućnost primene različitih sinergističkih kombinacija ovih jedinjenja. Pored potencijalne visoke efikasnosti, etarska ulja poseduju i mnoge druge osobine dobrog antihelmintika, kao što su verovatna manja mogućnost razvoja rezistencije kod parazita, niska toksičnost za životinje i manje količine rezidua, zbog čega predstavljaju obećavajuću alternativu u borbi protiv antihelmintičke rezistencije. Međutim, potrebna su dodatna *in vivo* ispitivanja, kao i studije toksičnosti kako bi se ovi zaključci potvrdili.

### Literatura

1. Shalaby H.A. 2013. Anthelmintics resistance: how to overcome it?. *Iranian Journal of Parasitology*, 8, 1, 18-32.
2. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S., Belebani R.O. 2016. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology*, 228, 70-76.
3. Pinto N.B., de Castro L.M., Azambuja R.H.M., Capella G.D.A., de Moura M.Q., Terto W.D., Freitag R.A., Jeske S.T., Villela M.M., Cleff M.B., Leite F.P.L. 2019. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 28, 4, 807-811.
4. Veerakumari L. 2015. Botanical anthelmintics. *Asian Journal of Science and Technology*, 6, 10, 1881-1894.
5. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., de Oliveira L.M.B., Macedo I.T.F., Rondon F.C.R., Bevilaqua C.M.L. 2018. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinari*, 46, 1522, 1-14.
6. Butnariu M., Sarac I. 2018. Essential oils from plants. *Journal of biotechnology and biomedical science*, 1, 4, 35-43.
7. Fokou J.B.H., Dongmo P.M.J., Boyom F.F. 2020. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In: *Essential Oils – Oils of Nature*, edited by Hany El-Shemy, IntechOpen.
8. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines (Basel)*, 3, 4, 25.
9. Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G.C., Daglia M. 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, 2017, 22, 70.
10. Morsy N.F.S. 2016. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. In: *Active Ingredients from aromatic and medicinal plants*, edited by Hany El-Shemy, IntechOpen.
11. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K., Huuskonen J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF-κB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 2979-2999.
12. Zwenger S., Chhandak B. 2008. Plant terpenoids: application and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3, 1, 1-7.
13. Ligan K. 2018. A review of major constituents of various essential oils and its application. *Translational Medicine (Sunnyvale)*, 8, 201.
14. Barra A. 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural Products Communications*, 4, 8, 1147-1154.
15. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Freitas R.M., de Morais S.M., de Melo J.V., Bevilaqua C.M.L. 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, 218, 15, 52-58.
16. André W.P.P., Cavalcante G.S., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Morais S.M., de Melo J.V., Bevilaqua C.M.L. 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep

- gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 26, 3, 323-330.
17. Elissondo M.C., Albani C.M., Gende L., Eguaras M., Denegri G. 2008. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitology International*, 57, 2, 185-190.
  18. Maggiore M., Elissondo M.C. 2014. In vitro cestocidal activity of thymol on *Mesocostoides corti* tetrathyridia and adult worms. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 4, 268135.
  19. Katiki L.M., Barbieri A.M.E., Araujo R.C., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S. 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243, 2017, 47-51.
  20. Zhou F., Ji B., Zhang H., Jiang H., Yang Z., Li J., Yan W. 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 1, 311-316.
  21. Katiki L.M., Araujo R.C., Ziegelmeyer L., Gomes A.C.P., Gutmanis G., Rodrigues L., Bueno M.S., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S., Amarante A.F.T. 2019. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 197, 2019, 36-42.
  22. Barbieri A.M.E., Louvandini H., de Araujo R.C., da Costa R.L.D., Fornazari B.C., Katiki L.M. 2014. Formulation containing essential oils: potential for anthelmintic activity against sheep gastrointestinal nematodes. *Boletim de Industria Animal*, 71, 2014.
  23. Williams A.R., Ramsay A., Hansen T.V.A., Ropiak H.M., Mejer H., Nejsum P., Mueller-Harvey, Thamsborg S.M. 2015. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Scientific Report*, 5, 14791.
  24. Ling F., Jiang C., Liu G., Li M., Wang G. 2015. Anthelmintic efficacy of cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil against *Dactylogyrus intermedius*. *Parasitology*, 142, 14, 1-7.
  25. Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Moraes S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A., Vieira L.S. 2007. Anthelmintic activity of *Croton Zehneri* and *Lippia Sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148, 3-4, 288-294.
  26. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Ratajac R. 2020. In vitro ovicidal effect of common juniper (*Juniperus communis* L.) essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinarski Pregled*, 1, 1, 152-159.
  27. Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.I., de Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M., Tome A.R., Nascimento N.R.F. 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173, 93-98.
  28. Saha S., Lachance S. 2020. Effect of essential oils on cattle gastrointestinal nematodes assessed by egg hatch, larval migration and mortality testing. *Journal of Helminthology*, 94, e111, 1-7.
  29. Temporim Novaes M. 2017. Chemical characterization and in vitro anthelmintic activity of citral and the essential oils *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon wynterianus* on adults of *Fasciola hepatica*. 2017. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.
  30. Vieira F.D.R.D. 2017. In vitro effects and chemical characterization of essential oils from *verum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* and its main compounds against *Fasciola hepatica*. 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

## **METABOLIZAM SLOBODNIH MASNIH KISELINA, HOLESTEROLA, TRIGLICERIDA I LIPOPROTEINA KOD KRAVA**

Radojica Đoković, Marko R. Cincović

*Agronomski fakultet Čačak, Univerzitet u Kragujevcu,  
Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu  
Kontakt: [radojicadjokovic@gmail.com](mailto:radojicadjokovic@gmail.com)*

### **Apstrakt**

Metabolizam masti kod preživara razlikuje se u odnosu na monogastrične vrste. U ovom radu je opisan metabolizam slobodnih masnih kiselina, holesterola, triglicerida i lipoproteina i njihov međusobna veza. Poznavanje metabolizma masti je od velikog značaja, jer kompleks najčešćih bolesti kod mlečnih krava u vidu insulinske rezistencije, ketoze i masne jetre direktno je vezan za metabolizam masti. Takođe, određivanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina i ketona predstavljaju najznačajniji aspekt procene zdravlja kod krava u različitim periodima laktacije.

Ključne reči: krave, lipidi, metabolizam.

### **Abstract**

Fat metabolism in ruminants differs from that of monogastric species. This paper describes the metabolism of free fatty acids, cholesterol, triglycerides and lipoproteins and their interrelationship. Knowledge of fat metabolism is of great importance, because the complex of the most common diseases in dairy cows in the form of insulin resistance, ketosis and fatty liver is directly related to fat metabolism. Also, the determination of the concentration of non-esterified fatty acids and ketones is the most important aspect of health assessment in cows in different lactation periods.

Key words: cow, lipid, metabolism.

### **Metabolizam slobodnih masnih kiselina**

Metabolizam masti kod preživara se razlikuje od metabolizma kod nepreživara. Naime, prirodna hrana preživara sadrži manji procenat masti, ali zbog unete velike mase, količina masti nije zanemarljiva. Zatim, zahvaljujući specifičnim aktivnostima mikroorganizama buraga dolazi do hidrogenizacije nezasićenih masnih kiselina, tako da je masno tkivo preživara uglavnom sastavljeno od zasićenih masnih kiselina. Takođe, sasvim malo masnih kiselina se resorbuje preko creva u obliku hilomikrona putem limfe, dok se najveći deo resorbuje u obliku nižih masnih kiselina kroz sluzokožu buraga.

Smatra se da su sirćetna kiselina, a u manjem stepenu i buterna, primarni supstrati za sintezu masnih kiselina kod preživara, odnosno da ulogu koju ima glukoza u lipogenezi kod nepreživara pripada acetatu kod preživara. Kod preživara postoje dva važna puta za ulazak slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju. Jedan je preko hilomikrona kao rezultat resorpcije triglicerida iz hrane, a drugi razgradnjom triglicerida u jetri i masnom tkivu.

Masne kiseline koje se koriste za sintezu jetrih triglicerida potiču u manjoj meri iz endogene sinteze u jetri iz acetyl-Co-A, a u većem delu iz preuzetih slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije koje uglavnom nastaju lipolizom iz masnog tkiva. U periodu zasušenja kod krava acetat se koristi za sintezu masnih kiselina u masnom tkivu, a u toku laktacije najveći "potrošač" acetata je mlečna žlezda u kojoj on predstavlja osnovni supstrat za sintezu mlečne masti.



Slobodne masne kiseline su u cirkulaciji u kompleksu sa albuminima i predstavljaju alfa-lipoproteinsku frakciju. Utvrđeno je u krvnoj plazmi goveda metodom gasne hromatografije 12 slobodnih masnih kiselina od kojih su palmitinska, stearinska, oleinska i linoleinska zastupljene u najvećem procentu. Osim toga, ustanovljeno je kod preživara, koji daleko češće uzimaju hranu u toku dana, da hranljive supstance stalno pritiču iz digestivnog trakta pa je zbog toga koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi relativno niska i na konstantnom nivou.

Slobodne masne kiseline su vrlo važan sastojak krvne plazme u procesu lipomobilizacije u peripartalnom periodu kod krava. Razlog velike varijabilnosti njihove koncentracije u krvi su njihov vrlo kratak poluživot od svega 2 do 3 minuta. Stoga se smatra da su slobodne masne kiseline metabolički najaktivniji sastojak masti u organizmu.

Neesterifikovane masne kiseline mogu da se metabolišu u svim tkivima osim u mozgu i testisima kod mužjaka. Međutim, najveći deo metabolizma masnih kiselina se odvija u jetri u sledećim metaboličkim procesima:

1. potpuna oksidacija masnih kiselina do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ;
2. delimična oksidacija masnih kiselina do acetyl-Co-A i sinteza ketonskih tela;
3. resinteza (reesterifikacija) masnih kiselina u trigliceride i njihov transport iz jetre sa VLDL-frakcijom lipoproteina;
4. resinteza triglicerida i njihovo zadržavanje u jetri sa mogućnošću nastanka masne infiltracije ćelija jetre.

### **Metabolizam holesterola**

Gotovo sve ćelije koje sadrže jedro sposobne su da sintetišu holesterol. To se naročito odnosi na ćelije jetre, kore nadbubrega, creva, kože, testisa i aorte. Za razliku od čoveka, kod koga je sinteza holesterola u crevima vrlo značajna, kod životinja se najveće količine holesterola sintetišu u jetri. Holesterol je tipičan proizvod životinjskog metabolizma, a kod biljojeda koji hranom unose vrlo malo holesterola, jetra predstavlja centralni organ sinteze ovog jedinjenja. Acetyl-CoA je izvor svih ugljenikovih atoma u holesterolu, a utvrđeno je da kod preživara u najvećem procentu potiče od acetata nastalog razlaganjem hrane u buragu.

Holesterol je osnovni prekursor žučnih kiselina, ali od holesterola se sintetiše 5 klasa steroidnih hormona: progesteron, hormoni kore nadbubrežne žlezde, hormoni folikula jajnika i hormoni testisa. Nakon sinteze u hepatocitima holesterol se prenosi u krv u obliku lipoproteina. Najveći deo holesterola nalazi se u LDL frakciji ( $\beta$ -lipoproteini) koji nastaju iz VLDL frakcije. Međutim, u uslovima u kojima je VLDL frakcija više zastupljena, proporcija holesterola u ovoj frakciji se povećava. Koncentracija LDL frakcije holesterola je u krvnom serumu krava niska. Takođe, u uslovima kada dolazi do povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi dolazi i do povećane sinteze i oslobađanja VLDL frakcije iz jetre.

Smatra se da je 80 do 90 posto holesterola u obliku estara sa višim masnim kiselinama, a ostali manji deo je u obliku slobodnog holesterola. Eliminacija holesterola se vrši posle njegove konverzije u žučne kiseline i preko žuči izlučuje se fecesom, a samo mali deo je u obliku neutralnih steroida. Utvrđeno je da kada se sadržaj holesterola u hrani povećava za 2 posto, endogena produkcija u jetri opadne za 10 do 30 posto. Pošto se osnovna sinteza holesterola odvija u jetri, do poremećaja u sintezi nastaje kod krava sa oštećenom funkcijom jetre.

Naime, više autora je utvrdilo opadanje koncentracije holesterola u krvi u peripartalnom periodu kod visoko-mlečnih krava koje imaju izražen energetske deficit. Tako su utvrđene značajno niže koncentracije holesterola u krvi kod krava sa masnom jetrom odmah nakon porođaja, što jasno ukazuje da pri oštećenju hepatocita opada i njihova sposobnost da sintetišu holesterol. Kod eksperimentalno izazvane nekroze tkiva jetre kod ovaca, utvrdio velike varijabilnosti u koncentraciji holesterola u krvi ogleđnih životinja, ali sa tendencijom opadanja.

Pokazano je da kod visoko-mlečnih krava dolazi do značajnog smanjenja koncentracije holesterola u krvi u peripartalnom periodu u odnosu na vrednosti utvrđene 2 do 3 meseca pre partusa, odnosno 1 do 2 meseca posle partusa. Ove promene su naročito izražene kod životinja gde je utvrđena masna infiltracija i

degeneracija ćelija jetre.

Kod krava sa visokom koncentracijom ukupnog holesterola u krvi pre teljenja, postoji mala verovatnoća da u periodu posle teljenja obole od ketoze ili drugih poremećaja metabolizma masti.

Uloga holesterola u metabolizmu kod preživara je vrlo važna, pošto životinje hranom unose male količine holesterola. Zbog toga se svaka promena u funkciji jetre direktno odražava na sintezu i metabolizam holesterola, kao i njegovih derivata, a naročito steroidnih hormona (glukokortikosteroidi i polni hormoni).

### Metabolizam triglicerida i lipoporteini kod krava

Subkutano masno tkivo predstavlja najznačajniji depo triglicerida u organizmu i utvrđeno je da je ono metabolički veoma aktivno. Naime, deponovani trigliceridi u masnom tkivu stalno podležu procesu lipolize i reesterifikacije (lipogeneze). Mnogi od nutricionih, metaboličkih i hormonalnih faktora regulišu metabolizam masnog tkiva i deluju kako na proces lipolize, tako i lipogeneze. Od balansa ova dva procesa, zavise količine triglicerida u masnom tkivu, odnosno koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvnoj plazmi. Pošto nivoi slobodnih masnih kiselina u krvi imaju najveći uticaj na metabolizam drugih tkiva, a naročito jetre i mišića, faktori koji utiču na masno tkivo i regulišu koncentraciju slobodnih masnih kiselina u krvi deluju indirektno i na ostala tkiva. Pošto se masti ne rastvaraju u krvi one se transportuju do drugih tkiva vezane za proteine krvne plazme (apoproteini). Drugim rečima, da bi se metabolizam masti odvijao neometano potrebno je da u krvi postoji odgovarajući "pool" transportnih lipoproteinskih sistema koji omogućavaju transport hidrofobnih molekula masti kroz vodenu sredinu krvne plazme. Lipoproteini se sintetišu od apoproteina i lipida u cisternama agranulisanog i granulisanog retikuluma i Goldžijevoj zoni hepatocita. Po podacima mnogobrojnih autora, lipoproteini se mogu svrstati u više frakcija na osnovu njihovog gradijenta gustine kod ultracentrifugovanja ili pokretljivosti pri elektroforezi (Tabela 1).

Tabela 1. Osnovne karakteristike lipoproteina krvne plazme goveda

Klasa	Elektroforetska pokretljivost	Dijametar (nm)	Gradijent gustine $S_f^0$	Sadržaj proteina %	Sadržaj masti %	
					Holesterol	Trigliceridi
Hilomikroni	slaba	80-5000	0,95	2	3-15	72-90
Lipoproteini vrlo male gustine (VLDL)	pre-beta	30-80	0,95-1,006	8	15-25	50-72
Lipoproteini male gustine (LDL)	beta	16-25	1,006-1,063	22	25-45	10-50
Lipoproteini velike gustine (HDL)	alfa	7-13	1,063-1,21	45	20-45	2-10

Legenda: VLDL - Very low density lipoprotein; LDL - Low density lipoprotein; HDL - High density lipoprotein;  $S_f^0$  - Svedbergova jedinica označava stepen flotacije.

Zbog male zastupljenosti hilomikrona u krvnoj plazmi kod preživara, glavni transportni sistem za trigliceride od enterocita do jetre, kao i od jetre do ekstrahepatičkih tkiva, redstavlja VLDL frakcija lipoproteina.

Poluživot hilomikrona i VLDL frakcije lipoproteina u krvnoj plazmi preživara, veoma je kratak, samo 2 do 11 minuta, što je jedan od razloga njihove vrlo niske koncentracije u krvi. Stoga su HDL frakcije zastupljene sa 70 posto, a LDL frakcije lipoproteina sa 20 posto od ukupne količine lipoproteina krvi.

Trigliceridi su najviše procentualno zastupljeni u VLDL frakciji, pa je uloga jetre u sintezi ove frakcije od velike važnosti za metabolizam triglicerida. Ukupni lipidi normalno čine oko 5 posto od ukupne mase jetre krava. U zdravoj jetri 75 posto masti čine fosfolipidi, a ostatak su najčešće trigliceridi.

Iako je sinteza triglicerida u jetri vrlo aktivna procesom esterifikacije slobodnih masnih kiselina koje potiču iz masnog tkiva, količina triglicerida u jetri je mala, pošto VLDL frakcijom lipoproteina vrlo efikasno mogu da se transportuju novosintetizovani trigliceridi iz jetre, a koji se koriste u metaboličke svrhe drugih tkiva. Smatra se da se trigliceridi u normalnim uslovima ne akumuliraju u jetri pošto se iz jetre transportuju istom brzinom kojom se i sintetišu. Zbog toga je uloga jetre u sintezi lipoproteina odlučujuća za normalno funkcionisanje metabolizma masti u organizmu.

Prema nekim podacima kod krava je ograničena sposobnost ćelija jetre da sintetiše VLDL frakciju lipoproteina, pa zbog toga postoji velika opasnost da se kod njih nakupe trigliceridi u jetri i tako nastane masna infiltracija i degeneracija hepatocita. Takođe je kod goveda utvrđeno, da je za vreme gladovanja sposobnost sekrecije VLDL frakcije lipoproteina jetre značajno smanjena. Kod krava kod kojih je nastala jetrina lipidoza, smanjeno je otpuštanje triglicerida iz jetre i zbog toga je koncentracija lipoproteina bogatih trigliceridima u krvnom serumu veoma niska.

Do smanjenja sinteze lipoproteinskih frakcija u jetri može doći i usled nedostatka metionina, donatora metil grupa, koji je jedan od osnovnih prekursora u sintezi lipoproteina. To može da bude jedan od razloga nakupljanja triglicerida u hepatocitima, čak i pri normalnoj sintezi i prilivu masnih kiselina u jetri.

Kod krava pri optimalnoj telesnoj kondiciji mast je prisutna u jetri približno oko dve nedelje pre teljenja, raste na približno 20 posto na jednu nedelju posle teljenja i opada polako na normalni nivo, manje od 5 posto, 26 nedelja posle teljenja. Ove promene u jetri krava su funkcionalne i reverzibilne i odnose se na metaboličke zahteve organizma za vreme kasnog graviditeta i rane laktacije (Reid i sar., 1983). Veliki zahtevi u energiji kod visoko-mlečnih krava pojavljuju se odmah nakon teljenja, što rezultira značajnim rastom mobilizacije masti iz telesnih rezervi, uglavnom iz potkožnog tkiva u cirkulaciju, a odatle masti se uglavnom transportuju u jetru, mišiće i bubrege. Osnovna karakteristika mobilizacije masti u organizmu je povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvi. To rezultira rastom jetrine lipogeneze, opadanjem sadržaja glikogena u jetri i neadekvatnim transportom lipoproteina iz jetre. Najveći procenat masti u jetri tada je u obliku triglicerida (95 posto), što je posledica ograničenog kapaciteta jetre preživara da sintetiše lipoproteine male gustine. Suprotno tome koncentracije fosfolipida u jetri se naglo smanjuju, što još više ograničava sintezu lipoproteina, a rezultat toga je nastanak masne infiltracije i degeneracije hepatocita.

Slobodne više masne kiseline krvi su glavni izvor masnih kiselina koje se koriste za sintezu triglicerida u jetri i lipoproteinske komplekse krvne plazme. U periodima mobilizacije masti, jetra preuzima i esterifikuje povećane količine slobodnih masnih kiselina. Međutim, sinteza lipoproteina nije srazmerna prilivu slobodnih masnih kiselina i zbog toga dolazi do nagomilavanja novosintetisanih triglicerida u hepatocitima, pa tako nastaje masna jetra. To znači, da pri velikom prilivu slobodnih masnih kiselina u jetru u vreme pojačane lipomobilizacije, jetra nije u stanju da izmetaboliše slobodne masne kiseline do krajnjih produkata metabolizma ( $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ) ili da ih reesterifikovane transportuje iz jetre pomoću VLDL frakcije lipoproteina, tako da se novosintetisovani trigliceridi zadržavaju u jetri. Zbog toga se velike količine stvorenog acetyl-Co-A, procesom  $\beta$ -oksidacije upotrebljavaju za intenzivnu produkciju ketonskih tela. To su osnovni razlozi zbog kojih kod visoko-produktivnih mlečnih krava posle partusa nastaju poremećaji u metabolizmu masti u jetri i kao posledica toga masna jetra i ketoza.

Od dinamičke ravnoteže metabolizma triglicerida u masnom tkivu, odnosno od procesa razgradnje do glicerola i masnih kiselina, kao i njihove ponovne reesterifikacije i uske povezanosti sa njihovim metabolizmom u jetri i otklanjanje iz jetre pomoću VLDL frakcije lipoproteina, u mnogome zavisi pravilno odvijanje metabolizma masti.

## Literatura

Dostupna kod autora

## **INFLAMACIJA, OKSIDATIVNI STRES I KETOZA KOD KRAVA**

Biljana Delić Vujanović<sup>1</sup>, Branislava Belić<sup>1</sup>, Radojica Đoković<sup>2</sup>,  
Nenad Staničkov<sup>1</sup>, Siniša Grubač<sup>1</sup>, Kosta Petrović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

<sup>2</sup>*Agronomski fakultet Čačak, Univerzitet u Kragujevcu*

*Autor za kontakt: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)*

### **Sažetak**

Peripartalni period je period intenzivnog metaboličkog stresa za mlečne životinje. Metabolički procesi u peripartalnom periodu nalaze se pod kontrolom veoma suptilnih homeoretskih kontrolnih mehanizama, kako bi se rad tkiva i organa prilagodio potrebama organizma u datom periodu. Oksidativni stres kod krava u peripartalnom periodu posledica je lipidne peroksidacije. Na osnovu ispitivanja oksidativnog statusa visoko mlečnih krava u tranzicionom periodu, došlo se do zaključka da je zajednički uzrok patoloških stanja u ovom periodu narušena ravnoteža između oksidanasa i antioksidansa, tj. pojava oksidativnog stresa. Kod krava u peripartalnom periodu je dokazano da je promena koncentracije lipida u plazmi povezana sa lipidnom mobilizacijom i može uticati na aktivnost leukocita i povećanje incidence bolesti. U sličnim ispitivanjima je dokazano smanjenje ukupnog broja leukocita u peripartalnom periodu ima za posledicu smanjenje odbrambenih sposobnosti organizma.<sup>30</sup> Sve navedeno govori u prilog inostrazivanju da je inflamacija važan faktor za nastajanje metaboličkih poremećaja u krava u tranzicionom periodu. Zapaljenske procese karakteriše oslobađanje proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora- $\alpha$ ), kao i interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji se smatraju esencijalnim citokinima za pokretanje sistemskog inflamatornog odgovora. TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora- $\alpha$ ) smanjuje proizvodnju glukoze u jetri, podstičući ujedno esterifikaciju masnih kiselina u obliku triglicerida. Povećana koncentracija proinflamatornih citokina može u značajnoj meri da utiče na metaboličko prestrojavanje u ranoj laktaciji, potencirajući nastanak metaboličkog stresa i lipidne mobilizacije i ketogeneze.

Ključne reči: krave, metabolički stres, oksidativni stres, inflamacija, ketoza.

### **Abstract**

The peripartal period is a period of intense metabolic stress for dairy animals. Metabolic processes in the peripartum period are controlled by very subtle home-theoretical control mechanisms, in order to adapt the tissue and organs to the needs of the organism in a given period. Oxidative stress in cows in the peripartum period is due to lipid peroxidation. Based on the examination of the oxidative status of high dairy cows in the transition period, it was concluded that the common cause of pathological conditions during this period is a disturbed balance between oxidants and antioxidants, ie. occurrence of oxidative stress. In cows in the peripartum period, a change in plasma lipid concentration has been shown to be associated with lipid mobilization and may affect leukocyte activity and increase disease incidence. Similar studies have shown a decrease in total leukocyte counts in the peripartal period, resulting in a decrease in the body's defense capabilities.<sup>30</sup> All of this indicates that inflammation is an important factor in the development of metabolic disorders in cows during the transition period.  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), as well as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), which are considered essential cytokines to trigger a systemic inflammatory response. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) reduces the production of glucose in the liver, encouraging at the same time the esterification of fatty acids in the form of triglycerides.

Key words: cow, metabolic stress, oxidative stress, inflammation, ketosis.

### Promene u oksidativnom statutu krava i povezanost sa ketozom

Peripartalni period je period intenzivnog metaboličkog stresa za mlečne životinje. Metabolički procesi u peripartalnom periodu nalaze se pod kontrolom veoma suptilnih homeoretskih kontrolnih mehanizama, kako bi se rad tkiva i organa prilagodio potrebama organizma u datom periodu.<sup>1</sup>

Oksidativni stres kod krava u peripartalnom periodu posledica je lipidne peroksidacije.<sup>2</sup> Za ovaj period karakteristična je intenzivna lipomobilizacija kao i velike promene u prometu energije koje predstavljaju značajan izvor oksidanasa i potencijalni okidač za nastanak oksidativnog stresa. Oksidativni stres možemo definisati kao međusobni odnos oksidanasa i antioksidanasa, odnosno oksidativni stres nastaje kao posledica disbalansa između proizvodnje reaktivnih metabolita kiseonika (*Reactive Oxygen Metabolites*, ROM ili *Reactive Oxygen Species*, ROS) i kapaciteta antioksidativnih mehanizama za njihovu neutralizaciju.<sup>3</sup> Oksidacija NEFA dovodi do povećane proizvodnje ROS što doprinosi razvoju oksidativnog stresa.<sup>4</sup>

Razlaganjem lipida putem oksidacije, nastaje međuproizvod malondialdehid (MDA) koji se često se smatra i indikatorom peroksidacije lipida u organizmu. Malondialdehid brzo reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom dajući reaktivnu supstancu TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*). Intenzitet oksidacije lipida može se utvrditi određivanjem koncentracije MDA i TBARS. Oksidativni stres je najintenzivniji u nedelji posle teljenja, jer je tada koncentracija MDA statistički značajno viša u odnosu na ostale periode laktacije.<sup>2</sup>

Postoji i pozitivna korelacija između telesne mase životinje u peripartalnom periodu i oksidativnog oštećenja, naime krave koje su pre teljenja imale prekomerno telesnu masu, su usled intenzivne lipomobilizacije u postpartalnom periodu bile osetljivije na oksidativni stres od životinja optimalne telesne kondicije.<sup>5</sup>

Bez obzira na veliki broj činioca koji se mogu dovesti u vezu sa nastankom oksidativnog stresa, glavni razlog koji dovodi do nastanka oksidativnog stresa i posledičnog oštećenja ćelija jeste smanjena ili nedovoljna antioksidativna aktivnost. Usled povećanja slobodnih radikala, kao prvi sistem odbrane aktivira se antioksidativna mreža koja se sastoji od antioksidativnih supstanci male i velike molekulske mase. Antioksidansi male molekulske mase su nešto brojniji, i u ovo grupu ubrajaju se glutation (GSH), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), vitamin C (askorbinska kiselina), karotenoidi, flavonoidi i dr.. Njihova aktivnost omogućena je enzimima dehidroaskorbat reduktazom i glutation reduktazom, koje ih nakon reakcije sa oksidansima vraćaju u neoksidisano stanje. Antioksidansi velike molekulske mase su manje brojni i uglavnom predstavljaju enzimske sisteme, kao što su supreoksid-dismutaza (SOD), koja katalizuje spajanje dva molekula superoksidnog radikala u jedan molekul vodonik-peroksida i jedan molekul kiseonika), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) koje katalizuju razlaganje vodonik-peroksida.

Na osnovu ispitivanja oksidativnog statusa visoko mlečnih krava u tranzicionom periodu, došlo se do zaključka da je zajednički uzrok patoloških stanja u ovom periodu narušena ravnoteža između oksidanasa i antioksidansa, tj. pojava oksidativnog stresa.<sup>6,7</sup>

Tranzicioni period je period negativnog energetskog bilansa, potrebe ploda i mlečne žlezde ne mogu biti zadovoljene količinom unete hrane, zbog čega dolazi do intenzivne lipomobilizacije koja za posledicu ima povećanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA). Jedan deo slobodnih masnih kiselina može da posluži kao izvor energija, ali usled intenzivne mobilizacije, javlja se veliki višak ovih kiselina preusmerava u pravcu sinteze ketonskih tela. Tom prilikom visoko mlečne krave ulaze u jednu od podvrsta oksidativnog stresa, označenu kao „metabolički“ oksidativni stres.<sup>8</sup>

Negativni energetski bilans i metabolički stres sa sobom povlače poremećaj zdravlja i reproduktivnih osobina i smanjenu dobrobit.<sup>9,10</sup> Antioksidativna zaštita visoko mlečnih krava uslovljena je nizom faktora, među kojima su partus i početak laktacije vrlo bitni. Na osnovu vršenih istraživanja utvrđeno je da se pri restriktivnoj ishrani, kao i u rasa krava sa manjom mlečnošću (manji nivo energetskog disbalansa) nivo oksidativnog stresa manji.<sup>11</sup>

### **Inflamatorni odgovor kod krava u ranoj laktaciji i njena povezanost sa ketozom**

Peripartalni period i početak laktacije, karakteriše veliki broj inflamatornih procesa koji dodatno opterećuju životinju u ovom tranzicionom periodu. Među najčešćim inflamatornim procesima navode se mastitisi i metritis koji nepovoljno deluju na energetski status jedinki tako što smanjuju količinu konzumirane hrane i pokreću lipolizu.<sup>12</sup>

Pojačana lipoliza u masnom tkivu dovodi do povećanja koncentracije NEFA u plazmi, dok pokretanje akutnog inflamatornog odgovora dovodi do povećanja koncentracije glukoze, a potom sledi hipoglikemija.<sup>13</sup>

Zapaljenske procese karakteriše oslobađanje proinflamatornih citokina TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora- $\alpha$ ), kao i interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji se smatraju esencijalnim citokinima za pokretanje sistemskog inflamatornog odgovora.<sup>13,14</sup>

TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora- $\alpha$ ) smanjuje proizvodnju glukoze u jetri, podstičući ujedno esterifikaciju masnih kiselina u obliku triglicerida.<sup>15,16</sup>

Povećana koncentracija proinflamatornih citokina može u značajnoj meri da utiče na metaboličko prestrojavanje u ranoj laktaciji, potencirajući nastanak metaboličkog stresa i lipidne mobilizacije i ketogeneze.<sup>17</sup> Citokini utiču na proces lipomobilizacije putem smanjenja apetita odnosno narušavanjem osetljivosti perifernih tkiva na insulin, kao i direktnom stimulacijom procesa lipolize.<sup>18</sup> Intenzivna lipomobilizacija ima za posledicu nastanak ketoze i masne jetre kod krava.<sup>19</sup>

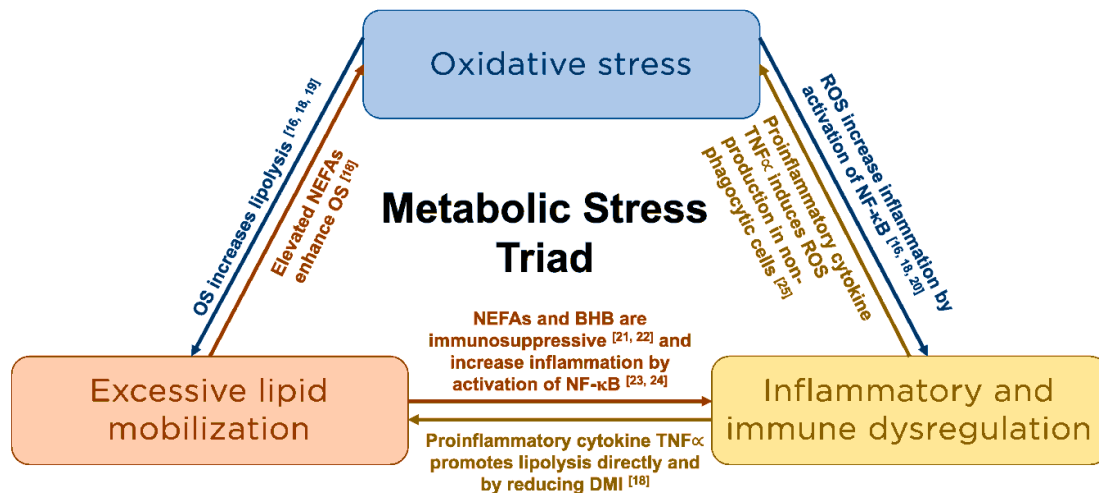
Citokina mogu imati direktan efekat na metabolizam jetre, a ujedno igraju mogu ključnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja krava u peripartalnom periodu, naročito kod onih izloženih inflamaciji ili opterećenih prekomernim količinama masti u telesnim depovima.<sup>20,21,22</sup> Ujedno citokini jetri pokreću sintezu pozitivnih proteina akutne faze (haptoglobina, serum amiloida-A i ceruloplazmina) što može da ima nepoželjan efekat na tranzicioni period krava.

Zapažen je značajan porast haptoglobina kod krava u toku različitih zapaljenskih procesa, a kod krava tokom partusa zabeženo je povećavanje koncentracije ovog proteina u odnosu na vrednosti zabeleženih pre i posle partusa.<sup>23</sup> Na osnovu sprovedenih istraživanja zabeleženo je i povećanje koncentracije haptoglobina i serum amiloida A tokom perioda rane laktacije.<sup>21,23,24</sup>

Naime, povećana sinteza haptoglobina, ceruloplazmina i serum amiloida-A u jetri je od velikog značaja jer pospešuje zarastanje i obnovu tkiva, ali može da umanja sintezu drugih apolipoproteina koji su neophodni za transport lipida iz jetre, povećavajući tako rizik za deponovanje masti u hepatocitima.<sup>25</sup>

Period rane laktacije pored povećanja koncentracije proinflamatornih citokina i proteina akutne faze, karakteriše i smanjenje koncentracije albumina, hemoglobina i holesterola.<sup>21</sup> Albumini čine većinski deo ukupnih proteina dok proteini akutne faze i njihove frakcije imaju minimalno učešće u ukupnoj koncentraciji proteina, tako da će smanjenje albumina biti vidljivo u ukupnoj koncentraciji proteina, bez obzira na povećanje proteina akutne faze na samom početku laktacije. Kako je jetra mesto sinteze albumina, smanjenje koncentracije ukupnih proteina i koncentracije albumina bi se moglo povezati sa smanjenom sintezom albumina u jetri tokom inflamacije.<sup>26</sup> Snižena albuminemija može se dovesti u vezu sa opterećenim funkcionalni kapacitet jetre u peripartalnom periodu.<sup>27,28</sup>

Kod krava u peripartalnom periodu je dokazano da je promena koncentracije lipida u plazmi povezana sa lipidnom mobilizacijom i može uticati na aktivnost leukocita i povećanje incidence bolesti.<sup>29</sup> U sličnim ispitivanjima je dokazano smanjenje ukupnog broja leukocita u peripartalnom periodu ima za posledicu smanjenje odbrambenih sposobnosti organizma.<sup>30</sup> Sve navedeno govori u prilog istraživanju da je inflamacija važan faktor za nastajanje metaboličkih poremećaja u krava u tranzicionom periodu.<sup>31</sup>



Slika 1: Trijada metaboličkog stresa: povećana lipidna mobilizacija, oksidativni stres i inflamacija.<sup>32</sup>

### Zahvalnost

Rad je deo projekta “Značaj određivanja i klinička evaluacija serumskog faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) u proceni inflamatornog odgovora preživara i pasa” finansiranog od strane Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrezovanje i naučno-istraživačku delatnost AP Vojvodine.

### Literatura

- Vernon R.G. (2002): Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. In: Kaske, M., Scholz, H., Holtershinken, M. (Eds.), *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine*, Klinik für Rinderkrankheiten, Tierärztliche Hochschule, Hannover, pp 210-223.
- Cincović M., Belić B., Stevančević M., Toholj B.: Oksidativni stres u peripartalnom periodu kod krava-ispitivanje lipidne peroksidacije., UDK 636.2:[616-008.9:577.334
- Sies, H. (1991): *Oxidative stress*, Academic Press Ltd., Orlando, FL.
- Miller J. K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F. C. (1993): *Oxidative stress, antioxidants, and animal function*. *Journal of Dairy Science* 76, 2812–2823.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A. (2005): *Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows*, *J. Dairy Sci.* 88:2017-2026
- Turk R., Juretic D., Gereš D., Svetina A., Turk N., Flegar-Meštric Z. (2008): *Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows*. *Anim Reprod Sci*, 108: 1-2, 98-106.
- Kankofer M., Albera E., Feldman M., Gundling N., Hoedemaker, M. (2010): *Comparison of antioxidative/oxidative profiles in blood plasma of cows with and without retained fetal placental membranes*. *Theriogenol*, 74: 1385-1395.
- Celi P., Di Trana A., Claps S. (2010): *Effects of plane nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period*. *Vet J*, 184, 95-99.
- Collard B.L., Boetcher P.J., Deckers I.C.M., Peticlerc D., Schaeffer L.R. (2000): *Relation between energy balance and health of dairy cattle in early lactation*. *J. Dairy Sci.* 83: 2683-2690.
- Reist M., Erdin, D., von Euw D., Tschuemperlin K., Leuenberger H., Hammon H.M., Morel C., Philipona C., Zbinden Y., Kuenzi N., Blum J.W. (2003): *Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows*. *Theriogenology* 59: 1707-1723.
- Weindruch R., Keenan K.P., Carney J.K., Fernandes G., Feures R.J., Floyd R.A., Halter J.B., Ramsey J.J., Richardson A., Roth G.S., Spindler S.R. (2001): *Caloric restriction mimetics: metabolic interventions*. *J Gerontol*, 56 (Special Issue1), 20-33.

12. Urton G., von Keyserlingk M.A.G., Weary D.M. (2005): *Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. J Dairy Sci* 88:2843–2849.
13. Kushibiki S., Hodate K., Ueda Y., Shingu H., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y. (2000): *Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. J. Anim. Sci.* 78 (8): 2164-2171.
14. Koj A. (1996): *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochim. Biophys. Acta.* 1317: 84-94.
15. Kettelhut I.C., Fiers W., Goldberg A.L. (1987): *The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. PNAS* 84(12):4273–4277.
16. García-Ruiz I., Rodríguez-Juan C., Díaz-Sanjuan T., del Hoyo P., Colina F., Muñoz-Yagüe T., Solís-Herruzo J.A. (2006): *Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. Hepatology* 44(3):581–591.
17. Sordillo L.M., Contreras G.A. and Aitken S.L. (2009): *Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. Anim. Health Res. Rev.* 10: 53-63.
18. Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Ueda Y., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y. (2001) *Effects of long-term administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism and growth hormone secretion in steers. Am J Vet Res* 62(5):794–798.
19. Ingvarsen K.L. (2006): *Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. Anim Feed Sci Technol* 126(3-4):175–213.
20. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H., Kawamura S. (2001): *Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. J Vet Med Sci* 63(9):1021–1025.
21. Ametaj B.N., Bradford B.J., Bobe G., Nafikov R.A., Lu Y., Young J.W., Beitz D.C. (2005): *Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. Can J Anim Sci* 85(2):165–175.
22. Loor J.J., Dann H.M., Janovick Guretzky N.A., Everts R.E., Oliveira R., Green C.A., Litherland N.B., Rodriguez-Zas S.L., Lewin H.A., Drackley J.K. (2006): *Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. Physiol Genomics* 27:29–41.
23. Uchida E., Katoh N. and Takahashi K. (1993): *Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. J. Vet. Med. Sci.* 55: 893-894.
24. Kovac G., Tothova C., Nagy O., Seidel H., Konvicna J. (2009): *Acute phase proteins and their relation to energy metabolites in dairy cows during the pre- and postpartal period. Acta Veterinaria Brno.* 78: 441-447.
25. Katoh N. (2002): *Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. J Vet Med Sci* 64:293–307.
26. Zentella P.M., Vázquez-Meza H., Piña-Zentella G., Pimentel L., Piña E. (2002): *Non-steroidal antiinflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. J Pharm Pharmacol.* 54 (4): 577-82.
27. Kaneko J.J., Harvey, J.W. and Bruss M. L. (Eds.)(2008): *Clinical biochemistry of Domestic Animals. London: Academic Press Limited.* 356–358, 883–895.
28. Tóthová C.S., Nagy O., Seidel H., Konvičná J., Farkašová Z., Kováč G. (2008): *Acute Phase Proteins and Variables of Protein Metabolism in Dairy Cows during the Pre- and Postpartal Period. Acta Vet. Brno.* 77: 51–57.
29. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H. and Sordillo L.M. (2010): *Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids, Journal of Dairy Science.* 93: 2508–2516.
30. Klinkon M., Zadnik T. (1999): *Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient period. Comparative Hematology International.* 9: 156-161.
31. Drackley J.K. (1999): *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? J Dairy Sci,* 82:2259–2273.
32. Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J. L., & Castillo, C. (2019). *Redox biology in transition periods of dairy cattle: Role in the health of periparturient and neonatal animals. Antioxidants,* 8(1), 20.



## **UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA RAZVOJ INFLAMACIJE I METABOLIZAM HOLESTEROLA KOD KRAVA U RANOJ LAKTACIJI**

Kosta Petrović<sup>a\*</sup>, Dragica Stojanović<sup>b</sup>, Taliya Hristovska<sup>c</sup>, Filip Štrbac<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Poljoprivredna škola sa domom učenika Futog*

<sup>b</sup>*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

<sup>c</sup>*Veterinarski fakultet Bitolj, Makedonija.*

\*Autor za kontakt: [kostapetrovic84@gmail.com](mailto:kostapetrovic84@gmail.com)

### **Sažetak**

Cilj ovog rada je da se utvrdi uticaj niacina na metabolizam holesterola i ispita kako se istraživani uticaj odražava na zapaljenske procese i funkcionalni status jetre kod krava u ranoj laktaciji. Ogled je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase: 15 koje su primale niacin i 15 krava u negativnoj kontroli. Niacin je aplikovan u periodu dve nedelje pre i dve nedelje posle teljenja. Krv je uzimana venepunkcijom v.coccigea kod krava u periodu pre jutarnjeg hranjenja, u momentu teljenja, potom jednu i dve nedelje nakon teljenja. Aplikacija niacina dovodi do smanjenja koncentracije tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), haptoglobina i nonesterified fatty acid (NEFA), dok na vrednosti fibrinogena nije pokazao značajan efekat. Aplikacija niacina povećava vrednost holesterola, albumina i smanjuje vrednost bilirubina, što je znak boljeg funkcionalnog stanja hepatocita. Niacin pored antilipolitičkog efekta, pokazuje i antiinflamatorni efekat koji može biti značaj mehanizam u zaštiti hepatocita u ranoj laktaciji kod mlečnih krava. Od velikog značaja se pokazao uticaj niacina na TNF- $\alpha$ , jer ovaj citokin kontroliše korelaciju između lipolize i metabolizma holesterola sa inflamatornim odgovorom, posmatrano kroz indeks funkcionalnog statusa jetre.

Ključne reči: krave, holesterol, jetra, niacin, tumor necrosis factor alpha.

### **Abstract**

The aim of this study is to determine the effect of niacin on cholesterol metabolism and functional liver status in cows in early lactation. The experiment was performed on 30 Holstein-Friesian cows: 15 receiving niacin and 15 cows in negative control. Niacin was administered for two weeks before and two weeks after calving. Blood was taken by venipuncture of v.coccigea in cows before feeding in the morning, at the time of calving, and then one and two weeks after calving. Niacin administration reduced the concentration of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), haptoglobin and nonesterified fatty acid (NEFA), while it showed no significant effect on fibrinogen values. Niacin administration increases cholesterol, albumin, and bilirubin levels, which is a sign of a better functional state of hepatocytes. Niacin, in addition to its antilipolitic effect, also exhibits an anti-inflammatory effect, which may be a significant mechanism in the protection of hepatocytes in early lactation in dairy cows. The influence of niacin on TNF- $\alpha$  has been shown to be of great importance, as this cytokine controls the correlation between lipolysis and cholesterol metabolism with an inflammatory response, viewed through an index of liver functional status.

Key words: cows, cholesterol, liver, niacin, tumor necrosis factor alpha.

### **Uvod**

U peripartalnom periodu kod krava razvija se stanje metaboličkog stresa koji se karakteriše smanjenim unosom hrane, negativnim energetske bilansom, povećanom lipolizom i ketogenezom i razvojem insulinske rezistencije (Sundrum, 2015; Cincović i sar., 2018; Lakić i sar., 2018). Povećana lipoliza kod krava može dovesti do odpuštanja veće količine proinflamatornih citokina iz masnog tkiva koji se nazivaju adipokini, a najvažniji je tumor nekroza faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) (Sordillo i Raphael, 2013).

Jetra je glavni organ metabolizma u ranoj laktaciji gde se prerađuje višak masti, a lipidna peroksidacija i izražena ketogeneza pored zamašćenja jetre, mogu pokrenuti i inflamatorni odgovor. Ohtuska i sar. (2001) su primetili povećanu aktivnost TNF- $\alpha$  u serumu kod krava sa umerenim do teškim sindromom masne jetre (Ohtuska i sar., 2001). Koncentracije haptoglobina i serum amiloida A su povećane u plazmi kod krava kod kojih se razvila masna jetra (Ametaj i sar., 2005). Bertoni i sar. (2008) su potvrdili da kod krava koje su klasifikovane kao krave sa visokim inflamatornim indeksom postoji viša vrednost bilirubina, AST, GGT i niža vrednost albumina i holesterola, što ukazuje na biohemijski profil masne jetre. Trevisi i sar. (2009) su potvrdili da inflamatorni medijatori direktno izazivaju metaboličke promene, tako što su vršili peroralnu aplikaciju interferon- $\alpha$  tokom poslednje 2 nedelje gestacije, što je dovelo do inflamacije jetre i oslobađanja proteina akutne faze.

Niacin ispoljava antilipolitički efekat i dovodi do smanjenja insulinske rezistencije u ranoj laktaciji i utiče pozitivno na funkcionalni status jetre (Cincović i sar., 2018a; Titgemeyer i sar., 2011). Antilipolitički efekat nikotinska kiselina ostvaruje posredstvom nikotinskog receptora GPR109A, dok nikotinamid ima malu mogućnost vezivanja za GPR109A receptor (Gille i sar., 2008). Aktivacijom GPR109A receptora, inhibira se aktivnost adenilat ciklaze, posledično se inaktiviraju proteinkinaza A i smanji fosforilacija hormon osetljive lipaze te se lipoliza smanjuje (Offermanns, 2006). Davanje antiinflamatornih lekova u peripartalnom periodu takođe dovodi do smanjenja lipolize i stabilizacije funkcionalnog statusa jetre (Kovačević i sar., 2019). Uzimajući u obzir da je lipoliza pokretač inflamatornog odgovora, a da niacin ima antilipolitičko dejstvo, te čuva holesterol, otvara se mogućnost i antiinflamatornog delovanja niacina (Li i sar., 2017).

### **Materijal i metode**

*Krave i menadžment* - Ogljed je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, bez znakova poremećaja zdravlja, uz proizvodnju mleka  $7500 \pm 950$  litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali se u tranzicionom periodu bile u porodilištu, gde je postojao vezani sistem. Ishrana krava je obročna, dok je u porodilištu posle partusa bila po volji. Krave su hranjene miksovanim obrokom kojim se zadovoljavaju kompletne potrebe krava. Krave uzimaju vodu ad libitum. Obrok za krave u ranoj laktaciji se pravi da zadovolji sledeće standarde: proteini (17,5-19,5% SM sirovih proteina, 30-33% razgradivih proteina od ukupnih, 35-40% nerazgradivih proteina od ukupnih); ugljeni hidrati (ADF minimum 17-21%, NDF minimum 28-31%, NDF iz kabaste hrane minimum 18-23%, nestrukturani ugljeni hidrati 35-42%, nivo suve materije iz kabaste hrane minimum 40-45%); energija (NEL 7-7,4 MJ/kg suve materije obroka); masti u obroku 5-7%.

*Aplikacija niacina* – Niacin je aplikovan putem hrane per os. Korišćen je Rovimix® Niacin u dozi koja omogućuje dostupnost u crevima oko 6-12g niacina/dan (60-120g krava/dan u hrani), što se u predhodnim istraživanjima pokazalo kao optimalna biološka koncentracija. Niacin je aplikovan u periodu dve nedelje pre i dve nedelje posle teljenja.

*Uzorkovanje krvi* – Krv je uzimana venepunkcijom v.coccigea kod krava u periodu pre jutarnjeg hranjenja kako bi se izbegao prandijalni efekat na vrednost metabolita. Krv je uzeta u momentu teljenja, potom jednu i dve nedelje nakon teljenja. Uzorci krvi za ispitivanje biohemijskih parametara su sakupljeni u desetomililitarske epruvete sa gel separatorom (BD Vacutainer® SST II Advance, BD Plymouth, UK) koji u sebi sadrži silikon koji je activator koagulacije i gel koji predstavlja barijeru između koaguluma i seruma nakon centrifugiranja. Uzeta krv je u najkraćem roku obrađena u laboratoriji.

*Određivanje parametara u krvi* – Biohemijske analize krvi određene su na automatskom spektrofotometru Chemray (Rayto, PRC). Koncentracija NEFA, albumina, holesterola i bilirubina određena je standardnim kolorimetrijskim kitovima proizvođača Biosystem (Spain). Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), haptoglobin i fibrinogen određeni su pomoću standardnih kitova proizvođača Cloud-Clone Corp i očitani na ELISA reader (Rayto, PRC).

*Holesterol* – Holesterol se određuje posle enzimatske hidrolize holesterol estera pod dejstvom holesterol esteraze, kada se dobija holesterol i masne kiseline. Izdvojeni holesterol se oksidiše pod dejstvom dodate

holesterol-oksidaze, kada se formira vodonik-peroksid. Vodonik peroksid reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom pod dejstvom peroksidaze dajući obojeni kvinoneimin.

### Rezultati

Aplikacija niacina dovodi do smanjenja koncentracije TNF- $\alpha$ , haptoglobina i NEFA, a porasta koncentracije holesterola i albumina, dok na vrednosti fibrinogena nije pokazao značajan efekat. Aplikacija niacina povećava vrednost albumina, holesterola i smanjuje vrednost bilirubina, uz povećanje vrednosti LFI (indeks jetrine funkcionalnosti), što je znak boljeg funkcionalnog stanja hepatocita. Nađena je pozitivna korelacija TNF- $\alpha$  sa fibrinogenom, haptoglobnom i NEFA, a negativna korelacija sa holesterolom i albuminom, što potvrđuje značaj albumina kao negativnog proteina akutne faze i ulogu lipolize u razvoju inflamacije kod krava u ranoj laktaciji. Holesterol negativno korelira sa vrednostima TNF- $\alpha$ , haptoglobinom i NEFA. Korelacija između holesterola i albumina sa haptoglobinom je kontrolisana preko TNF alfa, što ukazuje da antilipolitički efekat niacina ima direktan uticaj na antiinflamatorni efekat niacina, te združeni mogu biti dominantan način u zaštiti jetre.

Grafikon 1: Dijagram rasturanja – grafički prikaz korelacije u funkciji aplikacije niacina (NIACIN – zeleno, NEGATIVNA KONTROLA-plavo)

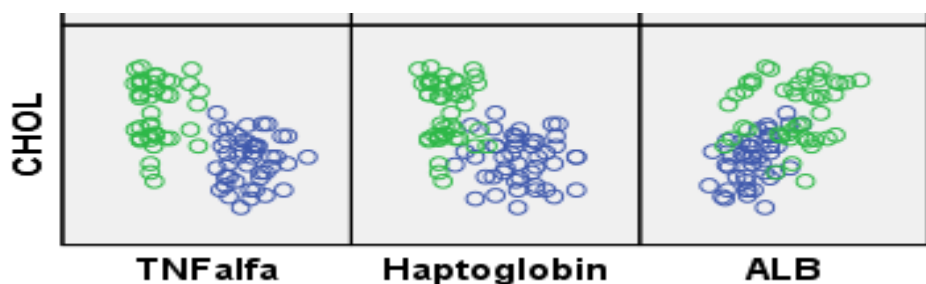
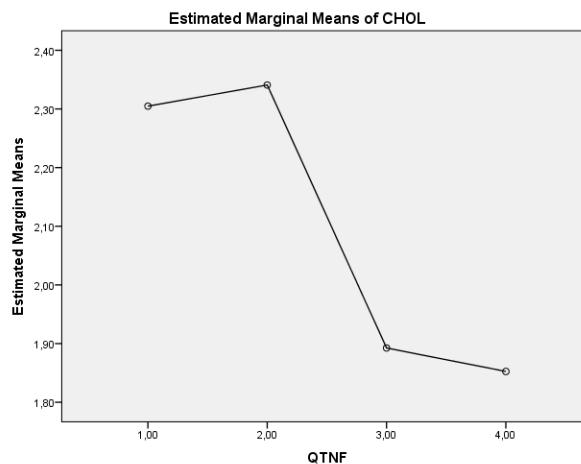


Tabela 1: Uticaj aplikacije niacina na vrednost ispitivanih parametara

	Nedelja	Niacin	Kontrola	SEM	Uticaj niacina
TNF- $\alpha$	0	0,24	0,39	0,004	p<0,01
	1	0,28	0,52		
	2	0,27	0,61		
Haptoglobin	0	0,39	0,76	0,012	p<0,01
	1	0,44	0,82		
	2	0,47	0,89		
Albumin	0	39,1	32,2	0,42	p<0,01
	1	37,82	31,5		
	2	38,9	33,6		
Chol	0	1,82	2,05	0,024	p<0,01
	1	1,93	2,19		
	2	2,08	2,41		

Grafikon 2: Uticaj aplikacije niacina i vrednosti TNFalfa na vrednost holesterola kod krava u ranoj laktaciji.



### Diskusija

Tranzicija iz perioda mirovanja mlečne žlezde, stanja potpune zasušenosti ili neaktivnosti u stanje laktacije predstavlja kritični period za metabolizam mlečnih krava, posebno za lipide, jer se naglo počnu mobilisati telesne rezerve masti. Zbog ove činjenice metabolizam masti, samim tim i holesterola ispitivan je u brojnim studijama sprovedenim na ljudima, oglednim životinjama i mlečnim kravama. Naime kod mlečnih krava važan metabolički poremećaj koji se dovodi u vezu sa povećanom mobilizacijom i metabolizmom masti je masna jetra (Grummer, 1993). Posebno tokom peripartalnog perioda metabolisanje masti je prvenstveno odgovorno za povećanje energije, te se jetra sve više opterećuje slobodnim masnim kiselinama, NEFA i njihovom daljom oksidacijom ili reesterifikacijom u trigliceride (Grummer, 1993). Prema podacima iz literature zabeležena je smanjena koncentracija holesterola, a povećana koncentracija bilirubina kod krava u peripartalnom periodu (Đoković i sar., 2014). Povišena koncentracija bilirubina se dovodi u vezu sa puerperalnom ketozom, dok je deficit holesterola posledica metaboličkih poremećaja (Đoković i sar., 2014). U našem istraživanju je nađen negativan korelacijski odnos između albumina i ukupnog bilirubina sa jedne strane, dok je koncentracija između albumina i holesterola bila pozitivna. Oba nalaza govore u prilog pretpostavci o dobroj očuvanosti funkcije jetre i sinteze holesterola, te hepatoprotektivnoj funkciji primenjenog niacina. Niže koncentracije ukupnog bilirubina se mogu objasniti manjim stepenom zamašćenja jetre sa NEFA i BHB. Kod ljudi glavni nosioci holesterola u krvi su lipoproteini niske gustine (LDL), oni prenose holesterol od jetre do perifernih tkiva. Suprotno ovom procesu, povratak holesterola iz ekstrahepatičnog tkiva u jetru se odvija preko lipoproteina visoke gustine (HDL), obrnutim procesom transporta. Ključni enzimi odgovorni za biosintezu holesterola su: 3-hidroksi-3-metilgliceril-CoA sintetaza (HMGCS1) i 3-hidroksi-3-metilgliceril-CoA reduktaza (HMGCR), uvek sa uzajamnom reakcijom, jer HMGCS proizvodi supstrat za HMGCR redukciju (Horton i sar., 1998). Većina sprovedenih studija je pokazala da se aktivnost ovih enzima kod mlečnih krava više ispoljava tokom rane laktacije, nego li u periodu kasnog graviditeta. Naime sintezu sterola kontrolišu sterol regulatorni element-vezujući faktori (SREBF-2), a sami se sintetišu u okviru membrane endoplazmatskog retikuluma. U slučaju niskog nivoa holesterola mogu se desiti modifikacije SREBF-a, koje dalje menjaju efekat SREBF-a sa ciljem povećanja sinteze holesterola, jedino se ne menja ekspresija mRNA. Naime kada je nivo holesterola nizak, SREBF kontrolišući faktori migriraju iz endoplazmatskog retikuluma u Goldžijev aparat, gde se nalaza target mesta preko kojih SREBF aktiviraju ciljne gene (Desvergen i sar., 2006). Neke studije navode da se na kraju graviditeta, pred neposredni početak laktacije povećava nivo m-RNA i SREBF-2 za koje se veruje da učestvuju u regulaciji biosinteze holesterola. Uočeno je da postoji pozitivna korelacija između ekspresije mRNA i SREBF-2 sa ekspresijom

HMGCR i HMGCS-1 a sve jasno ukazuje na pojačanu sintezu holesterola na samom početku laktacije. Pojedinačne frakcije lipoproteina u kojima lipidni deo sačinjava holesterol (VLDL, LDL, HDL) su značajno smanjene u periodu početka laktacije. Tokom rane laktacije i negativnog energetskog bilansa u jetri se iz NEFA pojačano sintetisuje trigliceridi a za njihovu evakuaciju iz jetre potreban je VLDL lipoprotein. Stoga je na početku laktacije sekrecija VLDL iz jetre smanjena, a trigliceridi se duže zadržavaju zbog manjka VLDL-a. U našem radu kod ispitivanja korelacije između holesterola sa TNF- $\alpha$  i haptoglobinom pokazana je negativna korelacija sa VLDL dok albumin sasvim suprotno, ima pozitivnu korelaciju sa holesterolom (grafikon 1). Ubrzo se iz ovakvog stanja razvije masna jetra (Gross i sar., 2013), iz ovga se jasno vidi da holesterol može biti ograničavajući faktor sinteze VLDL-a (Loor i sar., 2007). Da bi se holesterol sintetisao u dovoljnoj meri i učestvovao u izgradnji lipoproteina direktno zavisi od prisustva HMGCR i HMGCS-1. Smanjena koncentracija LDL-a u plazmi na početku laktacije, može biti posledica smanjene sinteze VLDL u jetri, jer LDL nastaje iz VLDL estara holesterola. Fosfolipidni transfer protein ima različite fiziološke funkcije, a najvažnija je prevođenje fosfolipida HDL iz VLDL (Tall i sar., 1985). Fosfatidilholini koji su inače frakcija fosfolipida, su esencijalne komponente za solubilizaciju holesterola (Rao i sar., 1997). Poznato je da, je jetra centralni organ metabolizma, te se tako i holesterol iz perifernih tkiva doprema u jetru gde služi kao glavna komponenta u sintezi HDL-a (Vaughan i Oram, 2006). Adenozin-trifosfat je vezujući transporter za periferni ćelijski holesterol, te tako smanjuje višak holesterola u organizmu otpremanjem u jetru na dalje metabolisanje. Druga studija je pokazala da insulin takođe ima indirektan uticaj na holesterol tako što povećava HMGCR in vitro (Bhasker i Fridemann, 2008), a kod pacova sa dijabetesom egzogeno aplikovani insulin je potpuno obnovio nivo HMGCR (Ness i sar., 1994). Međutim kada je reč o mlečnim kravama, ovi nalazi nisu potvrđeni niti ima analogije sa uticajem insulina na nivo HMGCR i HMGCS1, kao što je kod pacova. Poznato je da kod krava sem laktoze, glavni izvor energije za tele upravo čine mlečne masti, od kojih su trigliceridi sa udelom od (97-98%), dok je holesterol prisutan samo (0,5%), (Bitman i Wood, 1990). Samo mali deo holesterola mleka, potiče od de-novo sinteze u mlečnoj žlezdi, mnogo je izraženiji unos holesterola iz krvi (Long i sar., 1980).

### Zaključak

Na početku laktacije nivo holesterola u krvi opada, jer deo odlazi u mlečnu žlezdu. Niacin dovodi do porasta vrednosti holesterola uz opadanje vrednosti inflamatornih parametara. Zbog svega navedenog niacin pokazuje hepatoprotektivnu ulogu.

### Zahvalnost

Rad je deo projekta “Značaj određivanja i klinička evaluacija serumskog faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) u proceni inflamatornog odgovora preživara i pasa” finansiranog od strane Pokrajinskog sekretarijata za visoko obreazovanje i naučno-istraživačku delatnost AP Vojvodine.

### Literatura

1. Ametaj B.N., Bradford B.J., Bobe G., Nafikov R.A., Young J.W., Beitz D.C. (2005): *Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. Canadian Journal of Animal Science, 85(2): 165-175.*
2. Bhasker, C. R., and T. Friedmann. 2008. *Insulin-like growth factor-1 coordinately induces the expression of fatty acid and cholesterol biosynthetic genes in murine C2C12 myoblasts. BMC Genomics 9:535.*
3. Bitman, J., and D. L. Wood. 1990. *Changes in milk fat phospholipids during lactation. J. Dairy Sci. 73:1208–1216.*
4. Bertoni G., Trevisi E., Han X. and Bionaz M. *Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. J. Dairy Sci. 91(9): 3300-3310, 2008.*
5. Cincović, M. R., Đoković, R., Belić, B., Lakić, I., Stojanac, N., Stevančević, O., & Staničkov, N. (2018). *Insulin resistance in cows during the periparturient period. Acta Agriculturae Serbica, 23(46), 233-245.*

6. Cincović, M., Hristovska, T., & Belić, B. (2018a). Niacin, Metabolic Stress and Insulin Resistance in Dairy Cows. In *B Group Vitamins-Current Uses and Perspectives*. IntechOpen.
7. Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86:465–514.
8. Đjokovic R., Cincovic M., Kurcubic V., Petrovic M., Lalovic M., Jasovic B. and Stanimirovic Z. *Endocrine and Metabolic Status of Dairy Cows during Transition Period. Thai J Vet Med.* 44 (1): 59-66, 2014.
9. Gille A., Bodor E.T., Ahmed K., Offermanns S.: Nicotic acid: Pharmacological effects and mechanisms of action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:79-106, 2008
10. Gross, J. J., F. J. Schwarz, K. Eder, H. A. van Dorland, and R. M. Bruckmaier. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J. Dairy Sci.* 96:5008–5017.
11. Grummer, RR. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3882–3896.
12. Horton, J. D., I. Shimomura, M. S. Brown, R. E. Hammer, J. L. Goldstein, and H. Shimano. 1998. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* 101:2331–2339.
13. Kovačević, Z., Stojanović, D., Cincović, M., Belić, B., Davidov, I., Stojanac, N., Galfi, A. (2019). Effect of postpartum administration of ketoprofen on proinflammatory cytokine concentration and their correlation with lipogenesis and ketogenesis in Holstein dairy cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 22(3), 609-615.
14. Lakić, I., Cincović, M. R., Belić, B., Đoković, R., Majkić, M., Petrović, M. Ž., & Nikolić, S. (2018). Lipolysis and ketogenesis in cows in early lactation. *Acta Agriculturae Serbica*, 23(46), 265-276.
15. Li, Z., Li, X., Lin, S., Chen, Y., Ma, S., Fu, Y., Wei C., Xu, W. (2017). Nicotinic Acid Receptor GPR109A Exerts Anti-Inflammatory Effects Through Inhibiting the Akt/mTOR Signaling Pathway in MIN6 Pancreatic  $\beta$  cells. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 47(6), 729-737.
16. Long, C. A., S. Patton, and R. D. McCarthy. 1980. Origins of the cholesterol in milk. *Lipids* 15:853–857.
17. Loor, J. J., R. E. Everts, M. Bionaz, H. M. Dann, D. E. Morin, R. Oliveira, S. L. Rodriguez-Zas, J. K. Drackley, and H. A. Lewin. 2007. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol. Genomics* 32:105–116.
18. Ness, G. C., Z. Zhao, and L. Wiggins. 1994. Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. *J. Biol. Chem.* 269:29168–29172.
19. Offermanns S.: The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends. Pharmacol. Sci.* 27 (7):384-390, 2006.
20. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H. and Kawamura S. (2001): Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1021-1025.
21. Rao, R., J. J. Albers, G. Wolfbauer, and H. J. Pownall. 1997. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry* 36:3645–3653.
22. Sordillo L.M., Raphael W. (2013): Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Vet Clin Food Anim*, 29, 267–278.
23. Sundrum A: Metabolic Disorders in the Transition Period Indicate that the Dairy Cows' Ability to Adapt is Overstressed. *Animals* 2015, 5: 978-1020.
24. Tall, A. R., S. Krumholz, T. Olivecrona, and R. J. Deckelbaum. 1985. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J. Lipid Res.* 26:842–851.
25. Titgemeyer E., Spivey K., Mamedova L., Bradford B.: Effects of pharmacological amounts of nicotinic acid on lipolysis and feed intake in cattle. *Int. J. Dairy Sci.* 6:134–141, 2011.
26. Trevisi E., M. Amadori A. M. Bakudila and G. Bertoni. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. *J. Anim Sci.* 87(9):3020-3029, 2009.
27. Vaughan, A. M., and J. F. Oram. 2006. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47:2433–2443.

## REFERENTNI VREDNOSTI KRVNIH PARAMETARA KOD MLEČNIH KRAVA

Kovačević Vanja, Marko Cincović, Branislava Belić, Radojica Đoković,  
Kovačević Danijel, Ivana Lakić, Nenad Staničkov, Siniša Grubač

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Agronomski  
fakultet Čačak, Univerzitet u Kragujevcu,  
Autor za kontakt: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)*

### Apstrakt

Pre više od jednog veka započeto je sa istraživanjem metaboličkih bolesti kod krava. Izrada metaboličkih profila kao naučno verifikovana procedura započeta je sedamdesetih godina XX veka. Od tada do danas postoji veliki broj laboratorijskih indikatora koji se koriste za ocenu zdravstvenog statusa kod krava. Hematološki parametri služe za procenu inflamatornog odgovora (diferencijalan bela loza) i anemije (eritrocitni paometri) ili koagulacije krvi (trombociti) i predstavljaju značajne pokazatelje kod interpretacije različitih bolesti. Za procenu energetskeg bilansa određuje se koncentracija glukoze, NEFA i BHB. Za procenu funkcionalnog statusa jetre određuje se koncentracija proteina, jetrini enzimi i bilirubin, kao i holesterol i trigliceridi koji ukauju na razvoj masne jetre kao čestog metaboličkog problema. Od makroelemenata najvažnije je određivanje kalcijuma, magnezijma i fosfora. Pored navedenog kod krava se u istraživačke i praktične svrhe određuje koncentracija insulina, kortizola, tireoidnih hormona, IGF-I, progesteron i dr., koji regulišu celokupan metabolizam. Kod mlečnih krava postoje brojni faktori koji utiču na vrednost metaboličkih parametara. U okviru različitih istraživačkih zadataka autori ovog rada su izveli metaboličke profile i/ili krvne slike preko 3500 krava za proteklih deset godina. Kako bismo pravilno interpretirali metabolički profil kod krava u Laboratoriji za patološku fiziologiju smo izradili referentne vrednosti za populaciju krava čiji parametri su određivani u našoj laboratoriji. U ogled je ušlo 260 krava Holštajn-Frizijske rase u različitim periodima laktacije. Referentne vrednosti u velikom procentu odgovaraju referentnim vrednostima iz različitih literaturnih izvora. Zbog poznatog uticaja laktacije, u daljim istraživanjima potrebno je predstaviti referentne vrednosti u funkciji perioda laktacije, tako da zdrave krave u ranoj laktaciji predstavljaju posebnu referentnu grupu životinja. Ključne reči: krave, metabolički parametri, krvna slika, referentne vrednosti.

### Abstract

More than a century ago, research into metabolic diseases in cows began. The production of metabolic profiles as a scientifically verified procedure began in the 1970s. Since then, there are a number of laboratory indicators used to evaluate the health status of cows. Hematologic parameters are used to evaluate inflammatory response (differential white lineage) and anemia (erythrocyte parameters) or blood coagulation (platelets) and are significant indicators in the interpretation of various diseases. Glucose, NEFA and BHB concentrations are determined for energy balance assessment. Protein concentration, hepatic enzymes and bilirubin, as well as cholesterol and triglycerides, are determined to assess liver functional status, which contribute to the development of fatty liver as a common metabolic problem. The determination of calcium, magnesium and phosphorus is paramount in determining the mineral status. In addition to cows, the concentration of insulin, cortisol, thyroid hormones, IGF-I, progesterone, etc., is regulated for research and practical purposes, which regulate the overall metabolism. In dairy cows, there are numerous factors that influence the value of metabolic parameters. Within the framework of various research tasks, the authors of this paper have performed metabolic profiles and / or blood counts of over 3500 cows over the past ten years. In order to correctly interpret the metabolic profile of cows in the

Laboratory for pathophysiology (Department of Veterinary medicine Novi Sad), we have drawn up reference value for the cow population whose parameters were determined in our laboratory. The experiment included 260 Holstein-Friesian cows in different lactation periods. The reference values in large percentage correspond to the reference values from different literature sources. Due to the known influence of lactation, reference values should be presented in the further studies as a function of the lactation period, so that healthy cows in early lactation represent a special reference group of animals.

Key words: cows, metabolic parameters, blood count, reference value.

### Ispitivanja krvnih parametara kod goveda

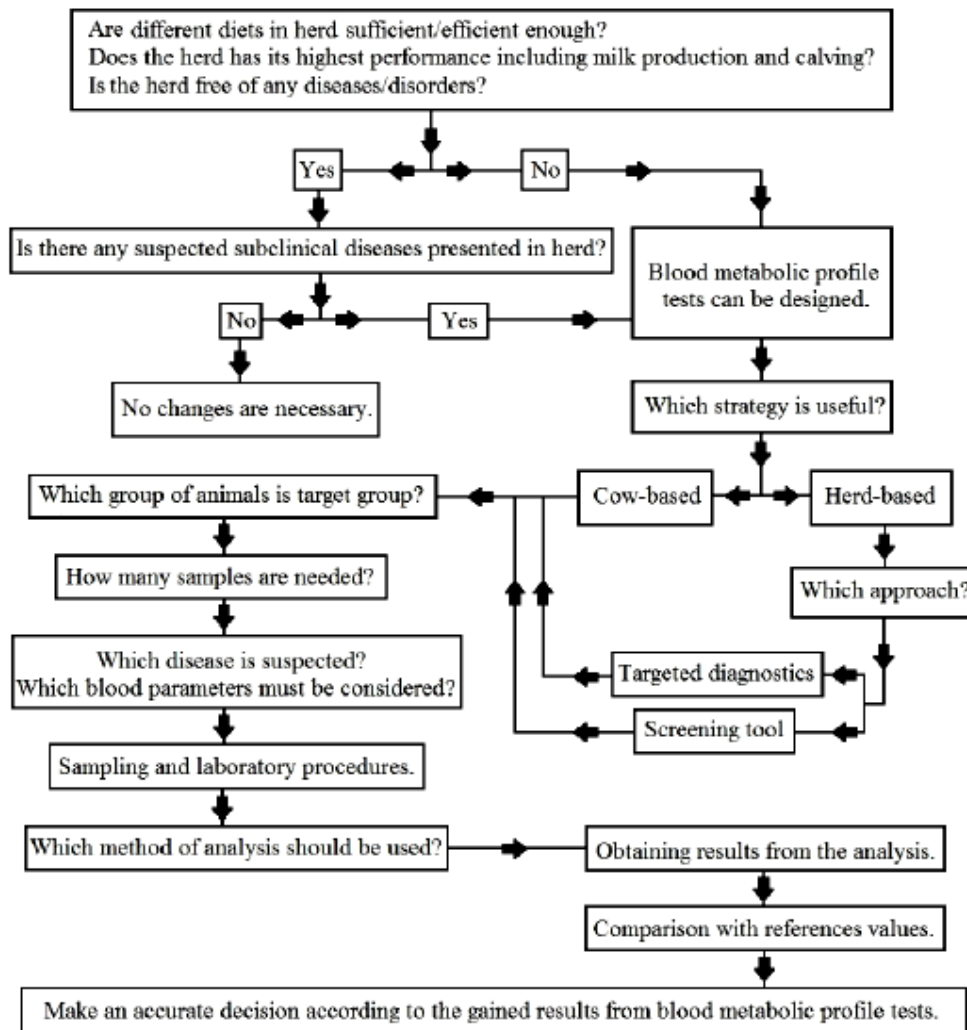
Određivanje metaboličkih parametara je veoma značajno u mlečnom govedarstvu. Laktacij sa sobom nosi različite adaptacije u metabolizmu koji za cilj imaju davanje prioriteta mlečnoj žlezdi u korišćenju metaboličkih potencijala. Ovakvo stanje se naziva homeoreza, a dugotrajna homeoreza uz negativane energetske bilans može brzo da dovede do različitih bolesti kod krava. Pored toga ispitivanje krvne slike je od velikog značaja jer metabolička prestrojavanja i negativni energetske bilans mogu biti vezani sa anemijama koje slabe odbrambenu sposobnost organizma i izmenjenim imunološkim odgovorom koji je vezan za promenu broja i funkcionalnog statusa krvnih elemenata bele loze. Ispitivanje metaboličkih parametara prolazi kroz više značajnih faza (modifikovano prema Overton i sar., 2017):

- *Sredina 1920-ih - Mlečnu groznicu karakteriše smanjena koncentracija Ca.*
- *Krajem 1920-ih - Koncentracije acetona su povišene u urinu i krvi krava sa ketozom.*
- *1930-e – Ispitivanje dinamike koncentracije Ca i P u krvi kod zdravih krava i onih sa mlečnom groznicom.*
- *1940-ih - Brzi napredak je postignut u razumevanju promena u hemiji krvi i urina u funkcijiketoze i povećanje znanja iz osnovne fiziologije.*
- *1950-te godine - Razvijeni su i ocenjeni prvi testovi za detekciju ketoze u mleku na farmi.*
- *1950-ih - Određuju se promene proteina u krvi i odnosi prema kolostrogenezi.*
- *1960-ih - Istraživanja ketoze su proširena na metabolizam lipida i cirkulirajuće neesterifikovane masne kiseline (NEFA); testovi ketona na mleku na farmi su dodatno usavršeni.*
- *1970-ih - Programi metaboličkog profila u krvi primenjuju se na ispitivanju stada sa različitim rezultatima.*
- *1980. - Epidemiološki pristupi se prvi put primenjuju da bi se utvrdili faktori rizika za i međusobne veze peripartalnih poremećaja.*
- *Sredina 1990-ih - Nesteterifikovane masne kiseline su prvi metabolički pokazatelj koji je ugrađen u opservacijske studije velikih razmera o zdravlju, proizvodnji i reprodukciji tokom peripartalnog perioda.*
- *Krajem 1990-ih - Infracrvena ispitivanja mlečnih ketona ocenjuju se sa fokusom na mlečni aceton.*
- *Sredina 2000-ih - Prve epidemiološke studije za rigorozno definisanje pragova nivoa metabolita u krvi krava u funkciji postporođajnog zdravlja.*
- *Sredina do kraja 2000-ih - Karakteristični su metabolički pokazatelji koji se odnose na upalu i oksidativni stres.*
- *Krajem 2000-ih - Određuju se granične vrednosti metabolita na nivou krave i nivou NEFA i BHB koji ukazuju da postoji opasnost za zdravlje krava.*
- *Krajem 2000-ih – POC testovi za BHB u krvi je potvrđena, pa oogućava pristupačno testiranje na farmi.*
- *Početakom 2010. - Prevalencija i implikacije subkličičke hipokalcemije su revidirane.*
- *Početakom 2010. godine - Određena je ekologija i ekonomija hiperketonemije.*
- *Početakom 2010. godine - Ispitivanje ketona u mleku je prošireno na BHB u mleku korišćenjem Fourier transformacione infracrvene spektroskopije.*
- *Početakom do sredine 2010-ih - Evaluacija buražnih senzora i drugih elektronskih vrsta nadzora nad zdravljem krava.*



- *Sredina 2010-ih – Interesovanje za metaboličke parametre u mleku za procenu i predviđanje metaboličkih pokazatelja raste.*
- *Druga polovina 2010-ih – Prepoznavanje klastera mlečnih krava na osnovu metaboličkih parametara.*
- *U budućnosti – Longitudinalno praćenje metaboličkog statusa krava, određivanje intraindividualnih vrednosti krvnih parametara, senzorsko praćenje parametara u krvi, data integration i big data na farmama krava.*

Šema 1: Algoritam u izradi metaboličkog profila (Madreseh-Ghahfarokhi i sar., 2018).



### Referentne vrednosti krvnih parametara krava izmerenih u Laboratorji za patološku fiziologiju Departmana za veterinarsku medicinu u Novom Sadu

#### Materijal i metode

Analize su vršene u Laboratorij za patološku fiziologiju koja je u periodu 2018-2019 godine uradila preko 20.000 analiza, poreklom od različitih životinjskih vrsta. Od 2008 do danas urađena je kompletna krvna slika i metabolički profil za preko 3500 krava. U ogled je uključeno 260 krava kojima je

vršena hematološka i biohemijska analiza krvi. Endokrinološka analiza krvi vršena je kod 45 krava. Preko 90% krava su krave Holštajn-frizijske rase, a ostatak su Simentalske rase.

Krv je uzimana u dva vakutajnera, sa ljubičastim čepom za hematologiju i sa žutim čepom za odvajanje seruma. Nakon centrifugiranja, odvojen je serum i analiziran na spektrofotometrijskom automatskom biohemijskom analizatoru marke Rayto Chemray 120Vet. Korišćene su sledeće metode za biohemijske analize krvi:

NEFA – Koncentracija NEFA određivana je kolorimetrijskom reakcijom koja se zasniva na acilaciji koenzima A od strane masnih kiselina u prisustvu dodane acil-CoA sintetaze kao katalizatora. Acil-CoA se oksidiše pod dejstvom dodate acil-CoA oksidaze uz proizvodnju vodonik peroksida. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze dozvoljava oksidativnu kondenzaciju 3-methi-N-etil-N( $\beta$ -hidroksietil)-anilina (MEFA) sa 4-aminoantipirinom, što daje ljubičastu boju.

BHB – Određivanje BHB se bazira na njegovoj oksidaciji do acetoacetata pomoću enzima 3-hidroksibutirat dehidrogenaze. Istovremeno sa ovim kofaktor NAD<sup>+</sup> se redukuje do NADH, što dovodi do razvoja boje.

Glukoza – Određivanje glukoze vrši se posle njene enzimatske oksidacije u prisustvu glukoza-oksidaze. Dobijeni vodonik-peroksid u ovoj reakciji dalje reaguje sa 4-aminofenazonom i fenolom u prisustvu peroksidaze kao katalizatora. Dobija se crveno-ljubičasta boja čiji se intenzitet meri.

Ukupni proteini – Proteini u serumu reaguju sa bakarnim jonom i u alkalnom rastvoru daju ljubičasti bojeni kompleks. Intenzitet ljubičaste boje je proporcionalan koncentraciji proteina.

Albumini – Albumini vezani za bromkrezol zeleno daju intenzivno zeleno bojenje proporcionalno koncentraciji albumina.

Urea – Urea u vodi pod dejstvom ureaze daje amonijum jon i ugljenik-četiri oksid. Amonijum jon reaguje sa salicilatom i hipohloritom dajući kompleks zelene boje.

Holesterol – Holesterol se određuje posle enzimatske hidrolize holesterol estera pod dejstvom holesterol esteraze, kada se dobija holesterol i masne kiseline. Izdvojeni holesterol se oksidiše pod dejstvom dodate holesterol-oksidaze, kada se formira vodonik-peroksid. Vodonik peroksid reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom pod dejstvom peroksidaze dajući obojeni kvinoneimin.

Trigliceridi – Trigliceridi se određuju enzimatskom reakcijom. Trigliceridi pod dejstvom lipaza daju glicerol i masne kiseline. Dobijeni glicerol sa ATP-om pod uticajem glicerol kinaze daje glicerol-3-fosfat, koji dalje oksidiše pod dejstvom dodate glicerol-3-fosfat oksidaze. Produkt ove reakcije je vodonik peroksid koji sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod dejstvom peroksidaze daje obojeni kvinoneimin.

Ukupni bilirubin – Bilirubin vezan za proteine se najpre odvoji pod delovanjem deterdženata. Ukupni bilirubin reaguje sa 2,4-dihloroanilin-om u prisustvu hidrohlorne kiseline, dajući obojeni azobilirubin.

AST – AST je enzim koji katalizuje transfer amino-grupe sa L-aspartata na  $\alpha$ -ketoglutarat, kada se dobija L-glutamat i oksalacetat. Oksalacetat sa NADH i H pod dejstvom malat-dehidrogenaze kao katalizatora daje obojeni L-malat i NAD<sup>+</sup>.

GGT – Gama-glutamyltransferaza je enzim koji katalizuje reakciju između L- $\gamma$ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilidin-a i glicilglicina, kada se dobija obojeni 5-amino-2-nitrobenzoat.

Kalcijum (Ca) – Kalcijumov jon daje ljubičasti kompleks sa O-krezolftalein kompleksom u alkalnoj sredini, na čemu se zasniva reakcija.

Fosfor (P) – Neorganski fosfor reaguje sa amonijum molibdatom u prisustvu sulfurične kiseline i formira obojeni fosfomolibdat kompleks, kada se meri kolorimetrijska reakcija.

Endokrinološke analize vršene su pomoću TOSOH AIA-360.

Hematološke analize vršene su na aparatu Nihon Kohden Celtac, sa softverom za goveda.

Statistika: Urađena je deskriptivna statistika za sve ispitivane parametre, grafičku su predstavljene distribucije frekvencije. Distribucije frekvencije i QQ plotovi za odstupanje od normalne distribucije su grafički predstavljani.

Rezultati ispitivanja prikazani su u tabelama koje slede:

Tabela 1: Referentne vrednosti važnijih krvnih parametara kod goveda

	<b>TPROT</b>	<b>ALB</b>	<b>GLOB</b>	<b>TBIL</b>	<b>AST</b>	<b>GGT</b>	
Mean	69,8714	32,3571	37,5150	9,1059	113,4892	23,8458	
Std. Deviation	6,84270	5,12158	7,74517	6,70016	48,25174	8,59472	
Skewness	-,216	-,366	,162	2,170	2,479	,459	
Std. Error of Skewness	,151	,151	,151	,151	,151	,151	
Kurtosis	-,305	-,089	,543	5,795	11,422	,047	
Std. Error of Kurtosis	,301	,301	,301	,301	,301	,301	
Percentiles	25	65,0000	29,0000	33,0000	4,6350	84,0000	18,0000
	50	71,0000	32,9900	37,1500	6,9750	100,0000	23,0000
	75	74,0000	36,0000	41,1000	11,3500	130,7500	29,0000

Tabela 1: Nastavak

	<b>Glukoza</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Urea</b>	<b>Holesterol</b>	<b>Trigliceridi</b>	
Mean	2,6103	2,2596	2,0661	4,6208	4,2591	,2144	
Std. Deviation	,75788	,31473	,39953	1,38144	1,67396	,09980	
Skewness	,172	,090	,588	,398	,132	,805	
Std. Error of Skewness	,151	,151	,151	,151	,151	,151	
Kurtosis	,462	3,237	2,462	-,147	-,541	1,249	
Std. Error of Kurtosis	,301	,301	,301	,301	,301	,301	
Percentiles	25	2,1100	2,0900	1,8700	3,6250	2,8125	,1400
	50	2,5500	2,2600	2,0600	4,5000	4,4750	,2100
	75	3,0875	2,4200	2,2300	5,4000	5,3000	,2700

Tabela 1: Nastavak

	<b>BHB</b>	<b>NEFA</b>	<b>WBC</b>	<b>Ly</b>	<b>Gr</b>	<b>RBC</b>	
Mean	,6755	,5028	10,9647	5,4657	5,6197	6,6131	
Std. Deviation	,28853	,22662	4,47698	3,25714	3,65395	1,10145	
Skewness	,710	,331	2,740	4,523	2,756	,433	
Std. Error of Skewness	,151	,151	,151	,151	,151	,151	
Kurtosis	,115	-,663	12,212	35,448	13,175	-,100	
Std. Error of Kurtosis	,301	,301	,301	,301	,301	,301	
Percentiles	25	,4500	,3200	8,4250	3,7963	3,7250	5,8000
	50	,6200	,4900	9,9000	4,9000	5,1000	6,5000
	75	,8900	,6900	12,3000	6,9000	6,9000	7,2875

Tabela 1: Nastavak

	<b>HGB</b>	<b>HCT</b>	<b>MCV</b>	<b>MCH</b>	<b>MCHC</b>	<b>PLT</b>	
Mean	92,5046	29,9092	50,6991	14,3189	316,3192	407,4646	
Std. Deviation	16,76138	3,69416	6,08619	1,67376	12,98566	167,58938	
Skewness	-1,046	-,162	,352	,053	,537	-,074	
Std. Error of Skewness	,151	,151	,151	,151	,151	,151	
Kurtosis	6,548	,702	-,469	-,360	1,913	-,977	
Std. Error of Kurtosis	,301	,301	,301	,301	,301	,301	
Percentiles	25	82,1000	27,9000	45,9000	13,2000	309,0000	255,0000
	50	92,0000	29,9000	50,0000	14,2500	315,0000	428,9500
	75	101,0000	32,0000	55,0000	15,5000	323,0000	537,9000

Tabela 1: Nastavak

	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>INSULIN</b>	<b>GH</b>
Mean	2,5756	113,8533	4,5178	41,6244
Std. Deviation	1,44696	55,76689	2,69960	18,86190
Skewness	1,607	1,223	,706	,153
Std. Error of Skewness	,354	,354	,354	,354
Kurtosis	4,275	1,033	,576	-,519
Std. Error of Kurtosis	,695	,695	,695	,695
Percentiles	25	1,6000	69,4500	2,3500
	50	2,3000	98,7000	4,4000
	75	3,3000	142,4000	6,4500

### Zaključak

Referentne vrednosti u velikom procentu odgovaraju referentnim vrednostima iz različitih literaturnih izvora. Zbog poznatog uticaja laktacije, u daljim istraživanjima potrebno je predstaviti referentne vrednosti u funkciji perioda laktacije, tako da zdrave krave u ranoj laktaciji predstavljaju posebnu referentnu grupu životinja.

### Zahvalnost

Rezultat je deo projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R.Srbije.

### Literatura

12. Belić B., Marko R. Cincović: *Laboratorijske tehnike u patološkoj fiziologiji*. Udžbenik, Novi Sad, 2019, ISBN 978-86-7520-474-9
13. Belić B., Marko R. Cincović: *Patološka fiziologija*. Udžbenik, Novi Sad, 2015, ISBN 978-86-7520-353-7
14. Belić B., Marko R. Cincović: *Praktikum iz patološke fiziologije*. Udžbenik. Novi Sad, 2012, ISBN 978-86-7520-246-2
15. Belić B., Marko R. Cincović: *Radna sveska sa priručnikom za polaganje ispita iz patološke fiziologije*. Novi Sad, 2012, ISBN 978-86-7520-247-2
16. Cincović M.R. (ur.), Jože Starič (ur.), Branislava Belić, Jožica Ježek, Silvestra Kobal, Zorana Kovačević, Martina Klinkon, Marija Nemec, Dragica Stojanović: *Laboratorijska istraživanja metaboličkog statusa goveda/ Laboratorijske raziskave pesnovnega stanja goveda*. Monografija, Novi Sad/Ljubljana 2017, ISBN 978-86-7520-440-4
17. Cincović M.R., Branislava Belić, Ivana Lakić: *Praktikum iz laboratorijskih tehnika u patološkoj fiziologiji*. Novi Sad, 2019, ISBN 978-86-7520-475-6.
18. Cincović M.R.: *Metabolički stres krava*. Monografija, Novi Sad, 2016, ISBN 978-86-7520-377-3.
19. Cincović M.R.: *Toplotni stres krava*. Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2010, ISBN 978-86-7244-911-2
20. Đoković R.D., Marko R. Cincović, Branislava M. Belić: *Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom periodu*. Udžbenik, Novi Sad, 2014, ISBN 978-86-7520-309-4
21. Madreseh-Ghahfarokhi, S., & Dehghani-Samani, A. 2020. Blood metabolic profile tests at dairy cattle farms as useful tools for animal health management. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23(1), DOI: 10.15547/bjvm.2161.
22. Overton, T.R., McArt, J.A.A., Nydam, D.V. 2017. A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. *Journal of dairy science*, 100(12), 10398-10417.

## **BIOHEMIJSKE PROMENE U KRVI I OSTALIM TELESNIM TEČNOSTIMA U POSTMORTALNOM PERIODU**

Nenad Staničkov, Ivana Davidov, Marko Cincović, Branislava Belić, Ivana Lakić

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

*Kontakt: [nenadstanicov@gmail.com](mailto:nenadstanicov@gmail.com)*

### **Sažetak**

Metaboliti su intermedijari malih molekula i proizvodi metabolizma koji imaju višestruke funkcije u normalnom rastu i razvoju ćelija, uključujući generisanje ćelijske energije, koja služi kao supstrat za sintezu makromolekula i ćelijske signale. Metaboliti mogu biti endogeni molekuli proizvedeni od strane domaćina, ili egzogeni molekuli dobijeni od hemikalija u namirnicama ili proizvedeni od mikroba. Relativne količine metabolita u tkivu pružaju informacije o ćelijskoj funkciji i mogu se menjati u odgovoru na endogene varijable. Metabolički profili u telesnim tečnostima odražavaju endogene promene i tako promene koje se javljaju nakon smrti trebale bi se manifestovati u izmenjenim profilima metabolita. Agonalni period, supravitalne reakcije (reakcije koje se javljaju od momenta smrti do prestanka ćelijskih funkcija), curenje usled degradacije ćelija i degradacija proteina trebalo bi da se reflektuju u profilima metabolita. To znači da analiza metabolita iz telesnih tečnosti može pružiti uvid u promenljivu biohemijsku okolinu post mortem.

Ključne reči: biohemijska, hematologija, krv, telesne tečnosti, postmortalni period.

### **Tkivne tečnosti leševa i utvrđivanje postmortalnog intervala (PMI)**

Postmortalna biohemijska (*tanatohemija*) je istraživanje biohemijskih parametara kod kadavera kako bi se utvrdila etiologija i okolnosti smrti i vreme od momenta nastanka smrti. Rezultati biohemijske analize teško je tumačiti zbog promena u krvi nakon smrti i nije moguće primeniti preanalitičke i analitičke metode koje se koriste u kliničkoj praksi za postmortalne analize. Postmortemska analiza hemijskih sastojaka krvi je teška ako se krv ne uzima odmah nakon smrti i pre nego što koaguliše. Stoga je upotreba očnih tečnosti (retinalna i staklena), kao i drugih tečnosti korisno sredstvo za ispitivanje promena sastavnih elektrolita, doprinoseći dijagnozi patoloških stanja, hemijskoj ekspoziciji i postmortem intervalu (PMI). U postmortem istraživanjima važno je znati koncentraciju analita i drugih fizioloških parametara pre ili u trenutku smrti da bi se izvršila detaljna analiza.

Jedan od najvažnijih i izazovnih problema forenzičkih patologa je tačna procena postmortemskog intervala (PMI). Glavni princip je izračunavanje tačnog momenta smrti. Do sada su se koristile različite metode za procenu momenta smrti, ali je njihova preciznost bili mala i postojala je mogućnost orijentacione procene. Fizička (algor mortis, livor mortis) i fizikokemijske (rigor mortis) promene sadrže glavnu osnovu za procenu PMI, posebno tokom prvih sati nakon smrti. Međutim, ove promene imaju ograničenja u određivanju PMI-a. U poslednjim decenijama razvija se grana tanatohemija, koja se bavi izučavanjem biohemijskih promena posle smrti. Napredak u određivanju PMI načinjen je kroz upotrebu biohemijskih parametara krvi, staklastog tela ili cerebrospinalne tečnosti uz korišćenje preciznih statističkih modela za procenu PMI. Kombinovanjem tradicionalnih i biohemijskih metoda dobilo se povećanje pouzdanosti PMI procena i suženje margina greške povezane sa pojedinačnim analizama. Važna karakteristika biohemijskih metoda je i mogućnost korišćenja rezultata za tačnu procenu PMI tokom prvih dana nakon smrti.

Tačna procena PMI zahteva procenu parametara koji su u visokoj korelaciji sa vremenom nakon smrti. Ove promene počinju odmah nakon smrti, iniciraju se na ćelijskom nivou i kasnije evoluiraju do hemolize, promene boje, oticanja i putrefakcije, između ostalih procesa. Tokom raspadanja leša, nekoliko

biohemijskih promena se odvijaju u svim telesnim tkivima zbog odsustva cirkulišućeg kiseonika i posledično prekida aerobne respiracije, izmenjene enzimske reakcije, prekida anaboličke proizvodnje metabolita, prekida transporta aktivnog membrana i promene u propustljivosti ćelija i difuzije jona.

Katabolička aktivnost ključnih enzima na proteine, lipide, ugljene hidrate i nukleinske kiseline i brzina ovog procesa mogu se koristiti za procjenu PMI. Dodatno, izlivanje elektrolita i promena pH u krvi, mogu biti izuzetni pokazatelji. Kao potencijalne ciljeve za određivanje PMI su predložene akumulacije nekoliko jona i metabolita kao što su bikarbonati, ugljen-dioksid, vodonikovi ioni, laktat, fosfor i mravlja kiseline. Tako su uvedene biohemijske procene kako bi se pomoglo preciznom procenom vremena od smrti. Sofisticirane, automatske, biohemijske metode su korišćene u određivanju vremena od smrti (PMI).

### **Biohemijske analize krvi u postmortalnom periodu**

U radu autora Costa, I., Carvalho, F., Magalhães, T., Guedes de Pinho, P., Silvestre, R. and Dinis-Oliveira, R.J., pod naslovom "Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval". koji je 2015. objavljen u časopisu Toxicology Research (4,6, pp.1443-1452) prikazana je dinamika promena koncentracije velikog broja krvnih parametara poreklom od 20 uzoraka ljudske krvi.

Koncentracije biokemijskih parametara analizirane su u 20 različitih uzoraka ljudske krvi kako bi se utvrdila potencijalna veza između ovih vrednosti i vremena smrti sa ciljem da se identifikuju oni koji predstavljaju dobre korelacije. Statistički značajno povećanje je zabeleženo u koncentraciji ureje između 27.84-33.49 mg/dL do 264 h ( $r = 0.973$ ,  $p < 0.001$ ). Koncentracija mokraćne kiseline se smanjila za 264 h između 3.39-2.80 mg/dL i pokazala jaku korelaciju ( $r = -0.980$ ,  $p < 0.001$ ) sa vremenom smrti. Ukupna i direktna koncentracija bilirubina značajno je smanjena tokom vremena od 0,67 do 0,30 mg/dL i od 0,14 do 0,01 mg/dL, respektivno ( $r = -0,964$  i  $r = -0,991$ ,  $p < 0,001$ ). U ovom ogledu je pokazano da glukoza, laktat i kreatinin nisu korelirali linearno sa vremenom smrti. Kada se radi o elektrolitima autori su pokazali da se koncentracija kalcijuma značajno smanjila i linearno od 8,45 do 3,70 mg/dL ( $r = -0,986$ ,  $p < 0,001$ ). Statistički značajno povećanje je zabeleženo u koncentraciji gvožđa između 100.72-188.49 mg/dL ( $r = 0.987$ ,  $p < 0.001$ ). Preostali elektroliti (tj. cink, natrijum, kalijum, magnezijum i fosfor) nisu korelirali linearno ili su pokazali nekoliko fluktuacija. Među lipidima (tj. fosfolipidima, lipoproteinima HDL i LDL, trigliceridima i holesterolom), autori nisu opazili nikakvu linearnu korelaciju između svakog od parametara i vremena smrti. Od svih proteina procenjenih u ovoj studiji, samo je transferin i IgM pokazao da su korisni za PMI procenu. Koncentracija transferina se značajno i linearno smanjuje između 340,64-275,09 mg/dL ( $r = -0,988$ ,  $p < 0,001$ ). Koncentracija IgM pala je linearno sa 112.37 na 103.00 ( $r = -0.967$ ,  $p < 0.001$ ). Preostali proteini (tj. ukupni proteini, albumini, komplemeni C3 i C4, IgA i G, feritin, b2-mikroglobulin, a1-antitripsin i CRP) nisu korelirali linearno ili su pokazali vremenske fluktuacija. Promene u aktivnostima nekoliko enzima takođe su procenjene. Koncentracija AST značajno je porasla i linearno između 25,23-40,75 U/L ( $r = 0,980$ ,  $p < 0,001$ ) tokom vremena. Koncentracija CK takođe se značajno povećala između 108.95-190.39 U/L ( $r = 0.968$ ,  $p < 0.001$ ). Ostali enzimi (ALT, amilaza, pseudoholinesteraza, ALP, CK-MB izoenzim, g-GT, LDH i lipaza) nisu korelirali linearno, dok su neki drugi enzimi pokazali fluktuacije sa vremenom (ceruloplazmin, ACP i CK-NAC izoenzim).

Rezultati ove studije su nam omogućili da ograničimo potencijalne biomarkere (totalni i direktni bilirubin, urea, mokraćnu kiselinu, transferrin, imunoglobulin M, kreatin-kinazu, aspartat aminotransferazu, kalcijum i željezo) radi preciznog procenjivanja PMI-a.

Koncentracije glukoze u krvi vrlo brzo smanjuju posle smrti uz istovremeno povećanje koncentracije laktata. Postmortemske koncentracije laktata su pokazale da su do 60 puta veće od antemortem perioda. U ovoj studiji koncentracija laktata progresivno se povećavala tokom vremena, glukoza se brzo smanjuje do 144 h. Zanimljivo je da je zabeležena povećana koncentracija glukoze u preostalom vremenu autolize. Razlog bi mogao biti taj što kako dekompozicija napreduje, ćelijske membrane postepeno se raspadaju kao rezultat procesa autolize i autofagije, pa se postmortemske koncentracije glukoze mogu povećati u krvi. Pored ovih mehanizama, glikogen se metaboliše do glukoze (tj. glikogenolize, koja se odvija inače u jetri), koji se ispušta u krv. Glukoza se takođe može formirati iz

izvora bez ugljenih hidrata (npr. laktat, aminokiseline i glicerol) putem glukoneogeneze, što doprinosi povećanju glukoze posle smrti.

Kreatinin je produkt degradacije fosfokreatina (tj. molekula za skladištenje energije u mišićima), koji se ispušta u krv. Studija pokazuje da se koncentracije kreatinina naglo povećavaju do 24 h, a zatim se stabilizuju u odnosu na preostali PMI. U mišićima je pronađena niža korelacija sa PMI, odnosno nije bilo značajnih promena u drugim uzorcima kao što su sinovijalna tečnost i staklasto telo.

U ovom ogledu je nađeno značajno povećanje koncentracije uree tokom vremena, što potvrđuje i druge studije koje se obavljaju sa postmortalnom krvlju. Međutim, u drugim medijumima, kao što je staklasto telo i sinovijalna tečnost, pokazano je da urea ostaje relativno stabilna. Razlog povećanja uree je taj što aminokiseline se oksidiraju, azot se zatim oslobađa kao amonijak i uglavnom se pretvaraju u ureu u jetru, prolazeći potom u krv. Nakon degradacije pirimidinskih baza, atomi ugljenika i azota stvaraju ugljen-dioksid i urea. Akumulacija amonijaka i uree usled aminokiseline i nukleotidnih katabolizma je prirodna posledica postmortalne dekompozicije. Mokraćna kiselina je takođe produkt izlučivanja koji sadrži azot, ali je izveden iz purinskih baza nukleinskih kiselina, a ne od proteina. Degeneracija purina proizvodi hipoksantin, koji se oksidiše ksantin-oksidadom u mokraćnu kiselinu. Enzimski aktivnost postmortem je inhibirana, jer zahteva kiseonik da bi mogao da funkcioniše. U ovoj studiji koncentracija mokraćne kiseline smanjena je linearno sa vremenom autofagije. Međutim, neke prethodne studije pokazale su da se mokraćna kiselina u krvi ostala relativno stabilno in vitro, dok se u krvi smanjila.

Ukupni i direktni bilirubin in vitro takođe je značajno i linearno opadao sa vremenom autofagije leša. Rezultati se mogu objasniti aktivnošću bakterijskih  $\beta$ -glukuronidaza kako bi se uklonili glukuronidne grupe i zatim redukovali bilirubin (proizveden oksidacijom hema) na urobilinogen i sterkobilinogen.

Analiza postmortemskih hemijskih promena elektrolita pokazale su dobre korelacije sa PMI za kalijum i natrijum, za koje se pokazalo da se povećavaju i smanjuju, u tečnosti staklastog tela. U ovoj studiji koncentracija kalijuma značajno se povećala do 168 h i smanjio se tokom preostalog vremena autolize. Koncentracija natrijuma in vitro na početku je ostala stabilna do 72 h, ali se značajno smanjila sa vremenom autofagije. Natrijum je najzastupljeniji katjon u ekstracelularnom prostoru, dok je kalijum u intracelularnom prostoru onaj koji preovladava. Ovi joni su neophodni za funkciju ćelije, odnosno za održavanje membranskog potencijala i regulaciju osmotskog pritiska. Nakon smrti ćelije gube njihovu normalnu morfologiju kao rezultat procesa autolize i truljenja. Tako, in vitro, povećanje koncentracije ekstracelularnog kalijuma u krvi rezultira uglavnom gubitkom kalijuma iz krvnih ćelija (tačnije eritrocita), a in situ može biti rezultat propadanja ćelija u zidovima sudova i ekstravaskularnim tkivima. U ovoj studiji nađeno je linearno i značajno povećanje koncentracije gvožđa in vitro tokom vremena autofagije. Ovi nalazi se mogu objasniti zbog curenja gvožđa iz eritrocita postmortem usled zbog hemolize i oslobađanja od transferina. Shodno tome, primećeno je da se koncentracija transferina znatno i linearno smanjuje sa vremenom autofagije. Feritin kao protein za skladištenje gvožđa u početku je pokazao povećanje, ali se smanjio sa vremenom raspadanja nakon 72 h. Kada se radi o ostalim elektrolitima, podaci pokazuju da se, slično kalijumu, koncentracija fosfora povećala postepeno do 168 h, ali se smanjila u odnosu na preostalo vreme raspadanja. Hlorid pokazao se kao vrlo nestabilan parametar tokom vremena raspadanja i stoga je isključen. Koncentracija magnezijuma povećana je in vitro do 96 h i ostala je praktično konstantna tokom preostalog vremena. Koncentracija cinka povećana je do 120 h, a zatim blago pala. Koncentracija kalcijuma znatno je smanjena i linearno sa vremenom raspadanja. Kalcijum igra važnu ulogu u regulaciji mnogih ćelijskih procesa (npr. krvne koagulacije, kontrakcije mišića i sekretornih procesa) pa se može pretpostaviti da je opadanje kalcijuma posledica potrošnje tokom procesa koagulacije i on je zadržan u fibrinu koaguluma.

Nekoliko studija povezuje koncentraciju lipida sa PMI. Lipoproteini krvi HDL i LDL su uključeni u transport lipida iz jetre u druga tkiva u telu. LDL je glavni nosilac lipida (npr. trigliceridi i holesterol) od jetre do perifernih tkiva (kao što su mišići). HDL je uključen u obrnuti transport lipida iz perifernih tkiva do jetre. U ovoj studiji koncentracije LDL i HDL lipoproteina u početku raste malo, ali su onda pokazale tendenciju da smanjenja tokom vremena. Koncentracija triglicerida in vitro pokazala je tendenciju smanjenja tokom vremena. In situ, smanjena je i koncentracija triglicerida u krvi, jer se u krvi hidrolizuju u masne kiseline i glicerol putem lipoproteinske lipaze. U masnom tkivu, trigliceridi se degradiraju i daju

masne kiseline i glicerol, pa se transportuju do jetre i mišića. Tamo se mogu koristiti za glukoneogenezu ili su direktno oksidovani. Koncentracije holesterola i fosfolipida in vitro pokazale su tendenciju povećanja do 48 h, a zatim blago padaju, sa nekim oscilacijama tokom vremena. Nek irezultati su pokazali da se nepredvidive fluktuacije javljaju u plazmatskim trigliceridima i koncentracijama holesterola u roku od 24 h nakon smrti.

Tokom postmortemskog razlaganja, proteini se razdvajaju putem enzimskih procesa u peptone, polipeptide i aminokiseline. Funkcija jetre održava se nekoliko sati nakon smrti, što pokazuje sposobnost da se izvede sinteza proteina na niskim nivoima uprkos postmortalnim uslovima. Ukupna koncentracija proteina je u početku porasla do 48 h, dostižući plato koji ostaje nepromenjen do kraja eksperimenta. Koncentracija albumin in vitro je neznatno povećana do 216 h, a zatim se smanjila tokom preostalog vremena truljenja. b2-Mikroglobulin je protein koji se nalazi na površini ćelija sa jedtrom kao što su limfociti. Ovi rezultati pokazuju da se koncentracija b2-mikroglobulina nije značajno promenila sa povećanjem vremena raspadanja.

Nekoliko sati nakon smrti, autoliza oslobađa intracelularne enzime (npr. proteaze, lipaze, amilaze) u krv. Eritrociti imaju visoke koncentracije AST i LDH enzima, a hemoliza može podići koncentraciju postmortem. Ova studija pokazuje da se AST značajno povećava sa vremenom raspadanja. Koncentracija ALT takođe se povećava, iako nije značajno, pošto se visoke koncentracije nalaze samo u jetri i bubregu. LDH je važan enzim koji katalizuje korak u anaerobnom metabolizmu glukoze i sintezi glukoze u skeletnim mišićima, jetri i eritrocitima. Koncentracija LDH in vitro se blago smanjuje tokom prvih 24 h, a zatim se povećava sa vremenom raspadanja. In situ, sa razgradnjom tkiva i autolizom (npr. ćelijama jetre i skeletnih mišića), enzimi se ulivaju u krv i zato se očekuje povećanje koncentracija transaminaza, LDH, ALP i ACP. Međutim, u ovoj studiji, ALP koncentracija in vitro se smanjio tokom vremena. Ovaj enzim je prisutan u visokim koncentracijama u jetri, kostima, crevima i bubregu, ali ne u krvnim ćelijama, zbog čega hemoliza ovih ćelija neće imati veliki uticaj na koncentraciju, a aktivnost enzima brzo se smanjuje u krvi. ACP (kisela fosfataza) je enzim prisutan u eritrocitima i hemoliza može podići koncentraciju u krvi. Visoke koncentracije ovog enzima posebno se nalaze u prostati i jetri. U ovoj studiji, ACP se pokazao kao veoma nestabilan parametar tokom vremena autofagije. Koncentracija GGT in vitro je ostala relativno stabilna do 192 h, što je opadalo tokom preostalog vremena raspadanja. Ovo je ćelijski enzim koji je naročito prisutan u visokim nivoima u jetri, bubrezima i pankreasu. Takođe smo otkrili da CK koncentracija značajno korelira sa vremenom raspadanja. Koncentracija izoenzima CK-MB povećava se neznatno do 96 sati i izraženije je u preostalom vremenu raspadanja. Izoenzim CK-NAC se pokazao kao vrlo nestabilan parametar za PMI procenu. CK se nalazi u većim koncentracijama u mišićnim ćelijama. CK katalizuje transfer fosfata iz adenzin trifosfata u kreatinin, kako bi se formirao fosfokreatinin. Rezultati in vitro pokazali su da je ovaj enzim ostao aktivan tokom vremena, jer je kreatinin proizvod razgradnje iz fosfokreatinina i povećan tokom vremena. In situ postoji povećanje koncentracije MB izoenzima CK usled otpuštanja ovog enzima u krv iz ćelijske lize u srčanom mišiću i nekrotičnog tkiva nakon smrti. In vitro, ceruloplazmin je takođe bio nestabilan parametar tokom vremena raspada. Ceruloplazmin je serumski enzim koji sadrži bakar, sintetiziran uglavnom u hepatičkim ćelijama i uključen je u oksidaciju gvožđa, tako da se može transportovati. Koncentracija amilaze je relativno stabilna in vitro do 120 sati, značajno opadajući u odnosu na preostale vreme. Enzim amilaze uglavnom proizvodi pankreas i pljuvačke žlezde. Ovaj enzim može doći do curenja u krvi zbog lize ćelija pankreasa, što se očekuje i povećava koncentracija postmortema in situ. Koncentracija lipaza u in vitro je blago opala i ostala je relativno stabilna do 264 h, sa nekim oscilacijama tokom vremena. Lipaza je enzim pankreasa koji hidrolizuje trigliceride na masne kiseline i glicerol. Pseudoholinesteraza je enzim koji je prisutan u krvi, ali se sintetiše u jetri. In vitro, koncentracija pseudoholinesteraze ostala je praktično konstantna do 216 h i smanjena tokom preostalog vremena. U prethodnoj studiji ovaj enzim pokazao je tendenciju da se smanjuje na vremenski nezavisni način u krvi postmortem.

Na svakoj definisanoj krajnjoj tački, uzorci krvi su takođe analizirani na pH, jer nakon smrti može biti uključeno nekoliko mehanizama (npr. autoliza ili raspadanje), što rezultira modifikacijama pH. U ovoj studiji, pH se smanjio veoma malo u poređenju sa početnim vrednostima (pH 7,45 do 7,10), a zatim se povećao na 7,74 do kraja studije. Pojedini autori su izvodili in vitro studiju sa uzorcima krvi od pacova i



ljudi i potvrdili da je pH samo blago smanjen (pH 7,4 do 7,1) u poređenju sa in situ studijom (pH 7,4 do 5,1) tokom 96-časovnog perioda. Pretpostavljamo da je akumulacija kiselih metabolita znatno veća in situ, a pH u krvi pada brže. Ovaj pad vrednosti pH se ne nastavlja na neodređeno vreme. I zaista, prethodno je objavljeno da će pH početi da raste nakon približno četiri dana. Visoke vrednosti pH su znak truljenja organske materije.

U studiji koju su izveli Donaldson, A.E. and Lamont, I.L. pod naslovom “Biochemistry changes that occur after death: potential markers for determining post-mortem interval” koja je objavljena 2013.godine u časopisu PLoS one (8,11, p.e82011), a korišćeni su podaci in situ, odnosno iz ljudskih kadavera, ali i leševa miševa i svinja, što je čini posebno zanimljivom za oblast veterinarske medicine.

Metaboličke promene koje se javljaju post mortem su identifikovane i pripisane agonalom periodu anoksije, nastavku biokemijskih promjena u ranom postmortalnom periodu i raspodjele lako difuznih supstanci između eritrocita i plazme, kao i između intersticijalne tečnosti, ćelije tkiva i krvi. Premortalna, odnosno zaživotna vrednost pH u krvi regulisana je da ostanu u uskom opsegu od 7,35 do 7,45. Ako je pH u krvi alkalna (veća od 7,45) ili kisela (manje od 7), to može dovesti do smrti, tako da je pH krvi jedan od najrelevantnijih sistema u organizmu. pH krvi reguliše se različitim sistemima pufera, a sa aspekta organskih sistema najznačajniji su urinarni i respiratorni organi.

Jedna rana studija je objavila da je posle smrti srčana krv, uzeta direktno iz 11 pojedinačnih ljudskih ostataka, pokazala promenu pH od 7,0 do 5,5. U istoj studiji, krv prikupljena od leševa pacova pokazala je smanjenje pH od 7,35 kod antemortema na 5,5 u momentu 96 sati posle smrti.

Niži pH mora da odražava akumulaciju kiselih metabolita. Laktatnu kiselinu proizvodi laktat dehidrogenaza iz piruvata putem anaerobne glikolize u skeletnim mišićima, jetri i crvenim krvnim zrnima kada je dovoljno kiseonika za piruvat da uđe u ciklus limunske kiseline. Ovaj proces se javlja prirodno u mišićnom tkivu tokom vežbanja i normalnog metabolizma unutar crvenih krvnih zrnaca. Normalna koncentracija laktata u serumu je 0,5-2,2 mmol/L. Cirkulišući laktat se normalno oksidira u piruvat pomoću dejstava laktat dehidrogenaze (LDH), nakon što je uzet preko transportnih proteina monokarboksilata (MCT) koji su diferencijalno izraženi u aktivnim respiratornim ćelijama i tkivima. U jednoj nedavnoj studiji o koncentraciji laktata u post-mortem krvi, laktat u krvi ljudskog srca povećao se 20 puta jedan sat posle smrti i 50-70 puta za 24 sata.

Najjednostavnija biohemijska promena koja se desila posle smrti je pad koncentracije kiseonika zbog odsustva cirkulacije, što dovodi do prelaska na anaerobni metabolizam uz odsustvo ciklusa limunske kiseline. Anaerobna glikoliza rezultirala je akumulacijom mlečne kiseline i povećanjem koncentracije NADH. Mravlja kiselina je takođe povećana postmortem verovatno zbog promena u bakterijskoj flori, a ne u metabolizmu jer za proizvodnju ovog metabolita trebaju enzimi koji funkcionišu na fiziološkom pH, kao i NAD<sup>+</sup> kao kofaktor. Nije jasno zašto su svinje i pacovi imali toliko velike razlike u koncentraciji mravlje kiseline postmortem. To može biti zato što mogu imati različitu bakterijsku mikrofloru. Akumulacijom mlečne kiseline i mravlje kiseline započinje pad pH postmortem. Osim toga, zbog toga što je sistem za cirkulaciju opao dovodi do brzog pada pH jer se proizvode kiseliji metaboliti. Smanjenje pH plazme je značajno jer se smatra da aktivira fibrinolizinske enzime koji sprečavaju zagađenje krvi što dovodi do povećanja tečnosti (nekoagulacije) krvi. Iako fibrinoliza nije ispitivana u ovoj studiji, postmortalna krv ostala je tečnost unutar pacova i svinja u toku perioda pregleda od 96 časova, u skladu sa aktivnostima enzima fibrinolizina.

Razlika koja se vidi u pH krvi u in vitro u poređenju sa in vivo studijama je zbog dva razloga. Prvo, krv u tubi nema rezerve glukoze za snabdevanje gorivom za anaerobni metabolizam, zbog čega ne dolazi do značajne akumulacije laktata kako bi se smanjio pH krvi. Drugo, eritrociti ne sadrže lizozome, tako da se ne javlja autoliza, što znači da kiseli ćelijski metaboliti kao što su ugljen-dioksid, vodonikovi joni, mravlja kiselina i mlečna kiselina koja se stvaraju unutar ćelija se malo izlučuju u odnosu na izlučivanje u lešu. Umesto toga, krvne ćelije koje se čuvaju u tubi, polako se degradiraju tokom vremena zbog toga što se proteine ćelijske membrane ne održavaju ili zamenjuju, što dovodi do sporije ćelijske lize, a ne autolize, pa se pH sporije smanjuje u poređenju sa krvlju leševa. Fumarat (mravlja kiselina) je najjednostavnija karboksilna kiselina. To je toksični metabolit metanola i formaldehida i normalno je prisutan kod sisara u niskim koncentracijama (0,12-0,28 mmol/L) nakon katabolizma nekoliko

aminokiselina, uključujući serin, glicin, histidin i triptofan kao i katabolizma metanola iz spoljnih izvora kao što je ishrana. Kod ljudi, on se brzo oksidira do ugljen-dioksida u jetri, kako bi se sprečili toksični efekti u mozgu i očima zbog inhibicije citohrom-oksidade u proteinskom kompleksu u respiratornom lancu mitohondrija.

Koncentracija amonijaka takođe se značajno povećala nakon smrti. Koncentracija amonijaka iz aminokiseline i nukleotidnog katabolizma kod pacova je porasla, a zatim se smanjena zbog mogućeg gubitka amonijaka isparavanjem. Moguće je da je razlike u konačnoj koncentraciji između prasadi i pacova posledica brzine rastvaranja, jer pacovi imaju složenu mikrobiologiju. In vitro eksperimenti pokazuju sličan profil, s tim što je koncentracija amonijaka znatno manja, što ukazuje na to da je ili amonijak izgubljen iz tube sa krvi ili je deo amonijaka u lešu nije poreklom iz krvnog tkiva. Potrebne su dodatne studije da bi se utvrdilo da li je razlika između pacova i svinja posledica razlika u brzini gubitka amonijaka ili metaboličkih razlika između vrste. Amonijak se formira u gotovo svim tkivima i organima pomoću katabolizma aminokiseline i nukleotida. Antemortem, amonijak se brzo uklanja iz cirkulacije od strane jetre gde se pretvara u ureu ili se uklanja iz skeletnih mišića ciklusom glukoze-alanina, ostavljajući samo tragove (11.6-32.2 mmol/L) u krvotoku. Tokom dekompozicije leša, amonijak proizveden iz aminokiselina, nukleotida i degradacije tkiva može se akumulirati tokom vremena, jer je nije uklonio jetrom, iako je amonijak nestabilan, takođe se može izgubiti od leša u okolinu. U jednoj studiji koja se odnosi na koncentracije PMI i amonijaka, prijavljeno je da se nakon smrti povećava koncentracija amonijaka u plazmi nakon brzog porasta u prvih 8 sati.

Koncentracije hipoksantina i koncentracije mokraćne kiseline pacova se povećavaju, a zatim polako smanjuju. Koncentracija hipoksantina i mokraćne kiseline u eksperimentima in vivo pacova bila je u suprotnosti sa koncentracijom čoveka i svinja. Razlog za ovu razliku može biti zato što pacovi imaju visoku koncentraciju pluća ksantin oksidaze. Ksantin-oksidaza pluća u krvi može da se difundira u krvotoku tokom hipoksije, gde brzo otklanja hipoksantin iz plazme tako što ga pretvara u mokraćnu kiselinu, što pokazuju eksperimenti hipoksantina i mokraćne kiseline. Pokazano je da je ksantin oksidaza zaista dovela do stvaranja mokraćne kiseline kod pacova vidjena je u eksperimentu sa alopurinolom. Ovo je bio neočekivan nalaz jer ksantin oksidaza zahteva kiseonik kao kofaktor za pretvaranje hipoksantina i ksantina u mokraćnu kiselinu [16]. Tačno kako ova reakcija može da nastavi post mortem nije poznata i zahteva dalja studija. Hipoksantin je intermedijar u putnoj vodi katabolizma. Antemortem se oksidiše ksantin oksidaza do uri kiseline, krajnji proizvod purinskog metabolizma kod ljudi. Enzim ksantin oksidaze kod sisara prisutan je uglavnom u jetri i sličnoj sluznici. Zbog toga što u krvi nema ksantin oksidaze, krajnji proizvod nukleotidnog katabolizma u krvotoku je hipoksantin, koji je uzimala jetra koja se pretvara u mokraćnu kiselinu i izlučuje se. Normalna koncentracija hipoksantina u krvi je 0,5-11 mmol/L. Tokom hipoksije tkiva koncentracije hipoksantina raste u plazmi, cerebrospinalnoj tečnosti i urinu zbog ograničenog raspoloživog kiseonika kao kofaktora za ksantin-oksidazu. Postoje dokazi da se koncentracija hipoksantina povećava tokom prvih 24 sata nakon smrti kod ljudi i životinja, ali detaljne studije nisu sprovedene. Razlike su takođe vidljive kod pacova između in vitro i in vivo eksperimenata. Kako razlaganje napreduje u lešu, purini iz krvnih ćelija, kao i različitih tkiva izlaze u ekstracelularnu tečnost, a zatim se pretvaraju u mokraćnu kiselinu u plazmi tokom 96-časovnog perioda. U krvi pacova koja se čuva u tubi, mokraćna kiselina ne povećava do 48 sati. Razlog za ovo kašnjenje je najverovatnije zbog razlaganja. Na primer, prethodna istraživanja su pokazala da je potrebno 48 sati da se bele ćelije počnu raspadati i oslobađati njihov sadržaj nakon smrti. Zbog toga što je potrebno 48 sati da se bele ćelije liziraju i to je glavni izvor purina koji je dostupan ksantin oksidazi u tubi, konstantna koncentracija mokraćne kiseline se održava sve dok bele ćelije ne počnu oslobađanje svojih purina. Mokraćna kiselina je krajnji proizvod purinskog metabolizma kod ljudi. Ona se formira u jetri i izlučuje se bubrezima (65-75%) i crevima (25-35%). Mokraćna kiselina je slaba kiselina koja pretežno cirkuliše u plazmi (98%) u obliku natrijumove soli (urati) i odličan je antioksidant, odgovoran za 2/3 ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme. Koncentracija mokraćne kiseline opisana je kao povišena u krvi odloženih traumatskih smrtnih slučajeva usled višestruke organske insuficijencije. Predloženo je da povećanje koncentracije mokraćne kiseline u odloženim traumatskim smrtnim slučajevima predstavlja proinflatorni marker koji

ukazuje na zapaljenje nekroze pre smrti. Kod drugih sisara kao što su pacovi, mokraćna kiselina degradira po dejstvom urikaze. Ljudima nedostaje enzim urikaze.

Od ispitanih markera, hipoksantin, amonijak i NADH mogu biti korisni kao PMI indikatori jer je ova studija pokazala da se njihove koncentracije povećavaju linearno posle smrti, te promene metabolita ne proizvode anaerobne bakterije tokom truljenja, tako da truljenje ne utiče značajno na proizvodnju ovih metabolita i mogu se vrlo brzo izmeriti i analizirati putem enzimskih ispitivanja. Zbog toga je ova studija pokazala da biokemijski markeri, odnosno metaboliti ekstrahovani iz post mortem plazme, imaju mogućnost pružanja pouzdane procene u pogledu vremena od smrti. Međutim, uprkos ispitivanim metabolitima, potrebno je više istraživanja da bi se razumelo uticaj različitih temperatura i vlažnosti na post-mortem metaboličke koncentracije, koje koncentracije ovi metaboliti postižu u krvotoku nakon više od 96 sati i ako su ove koncentracije metabolita uporedive sa postmortemom uzoraka ljudske krvi pre nego što budu u mogućnosti da se koriste za procenu PMI. Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) i njegova redukovana forma NADH su supstrati koji imaju centralne uloge u ćelijskom metabolizmu i proizvodnji energije kao koenzimi koji prihvataju hidrid i dodaju hidride u ciklusu limunske kiseline. Tokom hipoksičnih stanja NAD<sup>+</sup> ne može se regenerisati iz NADH koji se akumulira usled anaerobne glikolize i peroksizomnog katabolizma masnih kiselina.

### **Biohemijske analize staklastog tela u postmortalnom periodu**

Radovi u kojima je detaljno opisan značaj staklastog tela u postmortalnoj biohemijskoj analizi su: Kalra, J., Mulla, A. and Kopargaonkar, A., 2016. Diagnostic value of vitreous humor in postmortem analysis. *SM Journal of Clinical Pathology*, 1(1), p.1005 i Sachdeva, N., Rani, Y., Singh, R. and Murari, A., 2011. Estimation of Post-Mortem interval from the changes in Vitreous Biochemistry. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 33(2), pp.171-174. Ovi izvori su poslužili za pisanje teksta i čitanje ostalih predloženih radova koje su citirali.

PMI se može dobro izučavati pomoću tečnosti staklastog tela iz nekoliko razloga. To je dobro zaštićena i izolovana tečnost, a relativno je stabilan u odnosu na druge telesne tečnosti kao što su krv i CSF. U staklastoj tečnosti, energetski metabolizam se nastavlja relativno duži period, u poređenju sa krvlju i CSF. Proces difuzije je brž u drugim telesnim tečnostima nego. Autolitički proces je sporiji kod staklastog tela u odnosu na krv i CSF. Dobro je očuvana čak i u slučaju teške povrede glave. Manje je podložno kontaminaciji i zapaljivim promenama u odnosu na krv i CSF. Staklasto telo, odnosno tečnosti oka se mogu lako uzorkovati.

Analiza očne vode staklastog tela i određivanje PMI –Koncept analize hemijskih promena u intraokularnoj tečnosti u postmortemskim studijama uveden je 1960.godine. Analiza jonskog statusa je oduvek privlačila pažnju kao koristan alat za određivanje PMI. Nauman et al (1959) je uradio studije u 211 post mortem slučajeva. On je pokazao porast vrednosti K<sup>+</sup> u staklastom telu, uz koncentraciju od 7,2 mg/dl sa prosečnim post mortem intervalom od 9 sati.

Jaffe (1962) je analizirao 31 slučaj i povezala koncentraciju K<sup>+</sup> u staklastom telu i post-mortem interval. Našao je konzistentan porast nivoa K<sup>+</sup> koji počinje kratko nakon smrti, koji se nastavlja u narednih 125 sati. Nije postojala značajna razlika između leševa držanih u frižideru i onih koji se drže na sobnoj temperaturi.

Adelson i sar (1963) godine koriste 349 uzoraka od 269 slučajeva. Nije zabeležena nikakva značajna razlika kod nivoa K<sup>+</sup> između dva oka, što je određeno plamenskom fotometrijom. Pronađali su linijsku vezu između koncentracije vitamina K<sup>+</sup> i post-mortem intervala.

Studija Mulla isar. (2005) pretpostavljala je da se koncentracija biohemijskih sastojaka u staklastom telu u istom paru očiju menja sa istom brzinom i da se ova promena koja se javlja na vremenski zavisnom načinu može iskoristiti za tačnu procenu PMI. Zbog toga su u literaturi predložene mnoge jednačine i odgovarajuće formule, kako bi se precizno procenio postmortem interval. Najstarija i široko korišćena jednačina razvio je Sturner (1963) prema kojoj je postmortalni interval (h) = 7,14(K<sup>+</sup>)-39,1. Madea i sar. daju sledeću jednačinu linearne regresije gde je postmortalni interval (h) = 5,26(K<sup>+</sup>)-30,9.

Različiti faktori koji utiču na koncentraciju kalijuma u staklastom telu i moraju se uzeti u obzir prilikom procene vremena od smrti. Ovi faktori ograničili su upotrebu kalijuma za procenu PMI. Faktori koji utiču na koncentraciju kalijuma klasifikovani su kao unutrašnji i spoljni, pri čemu su uzorkovanja, instrumentacija i temperatura okoline, starost i antemortemski metabolički status bili značajni. Hipoksantin, ksantin i mokraćna kiselina rezultat su purinskog katabolizma. Hipoksantin (HKS) je metabolit purina koji se formira degradacijom adenozin-monofosfata (AMP) i povećava nivo zbog hipoksije, što dovodi do difuzije duž gradijenta koncentracije od retine u centar staklenog stenta. Utvrđeno je postojanje pozitivne linearne veze između nivoa HKS i temperature okoline. Tehnološka hromatografija visokih performansi (HPLC) je obično metod izbora za određivanje HKS u staklastom telu. Dobijene su linearne regresione jednačine da bi se utvrdila korelacija korišćenja kalijuma u relaciji sa HKS i ksantinom, kako bi se utvrdilo koja je komponenta efikasnija za određivanje PMI. HKS staklastog tela je neznan prediktor PMI u prisustvu kalijuma. Međutim, kada su ksantin i kalijum ugrađeni u regresioni model ksantin se pokazao značajan u predikciji PMI, dakle isključivo zajedno sa kalijumom. Bilo da se radi plamenom fotometrijom ili pomoću jonselektivnih elektroda nisu utvrđene značajne razlike između metoda. Ono što su rezultati pokazali je da je tačnost merenja mnogo bolja posle centrifugovanja staklastog tela i razblaživanja za potrebe određivanja jona i drugih biohemijskih parametara.

Detekcija glikemije i dijabetičke ketoacidoze pomoću konstituenata iz staklastog tela - Dijabetična ketoacidoza (DKA) je stanje koje se javlja zbog nedostatka insulina, kao što je kod pacijenata sa dijabetesom tipa I. Procenjuje se da se više od trećine smrtnih slučajeva zbog DKA javlja kod pacijenata sa dijabetesom koji nisu prijavili istoriju. Hiperglikemično hiperosmolarno stanje [HHS] takođe doprinosi incidenci smrti kod pacijenata sa dijabetesom. Glukoza u krvi je najčešće korišćeni marker koji određuje poremećaje metabolizma glukoze. U postmortemskoj analizi, antemortemski nivo glukoze u krvi ne koristi se u dijagnozi jer koncentracija glukoze u krvi posle smrti nije stabilna. Nakon prestanka srčanih i respiratornih funkcija, preživle ćelije nastavljaju metabolisanje glukoze u krvi, a glikoliza se nastavlja spontano, uzrokujući brzo smanjenje nivoa glukoze u krvi. Povećanje koncentracije glukoze u krvi usled mobilizacije jetrenog glikogena, kao rezultat otpuštanja ili primene kateholama tokom kardiopulmonalne reanimacije, predstavlja dodatnu komplikaciju prilikom procene nivoa glukoze u krvi antemortem. Varijacija nivoa glukoze u krvi na različitim mestima u telu je još jedna zamka u proceni nivoa glukoze u krvi nakon smrti. Zbog toga su korišćeni biohemijski sastojci prisutni u cerebrospinalnoj tečnosti i staklastom telu predloženi da otkriju povišene nivo glukoze u krvi u postmortemskoj analizi. Povišeni nivoi glukoze i ketona (BHB) mogu biti indikacija ovog stanja i mogu se dobiti i analizirati iz staklastog tela u periodu postmortem. Tečnost staklastog tela je matriks izbora zbog postmortalnih izmena koje uključuju metaboličke puteve glukoze, kao što je postmortalna glikoliza u krvi. Nivoi glukoze u tečnosti staklastog tela veći od 11 mmol/L imali su dijagnostički značaj. Nađena je koncentracija glukoze 11,6-63,2 mmol/L u staklastom telu kod dijabetičara, dok je kod zdravih iznosila 3,9-5,8 mmol/L. Zbir glukoze i laktata iznad 23,7 mmol/L tokom postmortalne analize znak je hiperglikemije sa fatalnim ishodom. Laktat nije pružio značajne informacije u PMI analizi. Ipak, još uvek ostaje da se raspravlja o upotrebi kombinacije glukoze i laktata u slučajevima antemortemske hiperglikemije.

### **Biohemijska ispitivanja cerebrospinalne tečnosti u postmortalnom periodu**

U radu *Schoning, P. and Strafuss, A.C., 1980. Postmortem biochemical changes in canine cerebrospinal fluid. Journal of Forensic Science, 25(1), pp.60-66* utvrđen je značaj biohemijskih promena u cerebrospinalnoj tečnosti kod pasa. U ovoj studiji korišćeno je deset odraslih muških pasa. Uzorci cerebrospinalne tečnosti antemortem su uzeti pod opštom anestezijom i prema svim medicinskim postulatima. Životinje su zatim humano žrtvovane brzom IV injekcijom visokih doza natrijum-tiopentalna i njihovi trupovi su držani na sobnoj temperaturi (22°C) za biohemijsku analizu nakon smrti. Cerebrospinalna tečnost (CSF) je uzorkovana u intervalima od nule, 4, 12, 36 i 48 sati nakon smrti. Svi uzorci CSF-a su pohranjeni -20°C do analize.

Postoje značajne promene u različitim elementima CSF u različitim intervalima postmortem, gde se koncentracija kalijuma povećala postepeno sa  $3,56 \pm 0,39$  antimortema na  $11,22 \pm 0,34$  posle 48 sati

postmortem. Stopa povećanja koncentracije kalijuma tokom vremena u CSF iznosila je 0,34 mEk/h, tokom prvih 12 sati postmortem, onda je postala 0,25; 0,20 i 0,16 mEk/h tokom sledećih 24 sata, 36 sati i 48 sati posle smrti, redom. Takođe, nivo natrijuma je povećan sa  $41,2 \pm 5,26$  antimortema na  $133,4 \pm 4,38$  u 48 časova postmortem, dok je nivo hlorida smanjen. Cink nije značajno promenjen, ali je bio blago povećan u 36. i 48. sati posle žrtvovanja. Nivo glukoze u CSF su bile značajno smanjenje i dostigle su  $15,3 \pm 1,96$  mg/dl u 48. času postmortem. Za razliku od toga, laktat je značajno povećan od  $9,3 \pm 0,60$  mg/dl do  $65,8 \pm 3,19$  i  $70,5 \pm 4,19$  mg/dl na 36 i 48 sati postmortem. Ukupni proteini i albumin pokazuju značajno smanjenje samo u kasnom intervalu postmortem (48 h). Na kraju, urea se pokazala značajno povećanje samo u 36 i 48 sati PM.

Rezultati su pokazali da se koncentracija nekih elemenata u CSF pasa sa različitim intervalima nakon smrti može koristiti kao referentni indikatori za procenu vremena nakon smrti sa posebnom pažnjom na nivo kalijuma koji se povećao linearno posle smrti, a takvo povećanje je bilo brzo u toku prvih 24 sati od smrti, pri čemu je stopa povećanja kalijuma bila 0,34 i 0,25 mEk/h, tokom prvih 12 i 24 časova postmortem, odnosno smanjena na 0,20 i 0,16 mEk/h tokom sledećih 36h i 48h posle smrti. Što se tiče koncentracije glukoze i laktata u CSF pasa, rezultati su otkrili postepeno i značajno smanjenje glukoze nakon smrti, dok je koncentracija laktata pokazala obrnuto što je logično jer glukoza u krvi i drugim telesnim tečnostima u lešu jednostavno nestaje u ranom postmortalnom periodu, a najvažniji proces koji doprinosi ovoj činjenici je glikoliza u kojoj se celokupni šećer u krvi metabolizuje do laktata (mlečna kiselina je konačni proizvod post-mortem glikolize, jedan molekul glukoze daje dva molekula mlečne kiseline). Ukupni proteini, albumin i urea nisu pokazivali značajne promene do 36 sati posle smrti, dok su ukupni proteini i albumini smanjeni dok se uree značajno povećava na 48 časova PM, a to se pripisuje procesu autolize i truljenja koji postaju očigledni nakon 24 sata posle smrti. Ovi rezultati ukazuju na to da su neki sastojci pokazali značajne promjene u ranim postmortalnim intervalima (kao kalijum, natrijum, glukoza, laktat), dok su ostali izrazito izmenjeni u kasnim intervalima (ukupni proteini, albumini i urea).

### Hematološke postmortalne promene

U studiji *Kundu, S. D., & Dutta, S. S. 2017. Changes in Haemogram in Subjects after Death As A Tool to estimate Time Passed Since Death. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSRJDMS), 16(10), 19-27* ispitane su hematološke promene posle smrti. Ukupno 84 slučajeva su odabrani nasumično u poznatom post mortem intervalu u rasponu od 0 do 48 sati nakon smrti uz starosnu grupu od 2,5 do 93 godine. Uzorak krvi prikupljen u bočici EDTA analiziran je pomoću automatskog ćelijskog brojača i procenjena vrednost hemoglobina, hematokrita, ukupnog broja RBC, WBC, trombocita. Vrijednost hemoglobina i hematokrita u postmortalnoj krvi nije bila u korelaciji sa vremenom koje je prošlo od smrti. Ukupan broj RBC i WBC snažno je u korelaciji sa PMI, iako su obrnuto korelirani. Ukupan broj trombocita je u velikoj meri povezan sa PMI. Pokazana je liza monocita, eozinofila i neutrofila koja se javlja u intervalu od 4 do 6 sati. Liza limfocita se javlja u intervalu od 8 do 10 časova. Liza RBC se javlja u 18 sati. Trombociti postaju neidentifikovani za 21 sat PMI.

U ovoj studiji ukupan broj trombocita je u velikoj meri povezan sa PMI. Ova korelacija je pozitivna korelacija što znači da je do 48 sati posle smrti došlo do porasta ukupnog broja trombocita s vremenom PMI. Očigledno početno povećanje broja trombocita u postmortemskoj krvi je prouzrokovano hipostatičkim fenomenima. Kasnije diskontinuirano smanjenje broja trombocita uprkos kontinuiranoj hipostazi u lešu delimično se može objasniti postmortemskom trombolizom i razvojem reverzibilnih agregata trombocita.

Pregled promene morfologije uobličjenih elemenata krvi u funkciji PMI prikazan je u tabeli koja sledi:

Postmortemski interval u časovima - Morfologija krvnih zrnaca 0-2h Normalna morfologija svih ćelija 3-4h Morfološka promena eritrocita 4-6h Liza membrane neutrofila, početak lize membrane ostalih polimorfonukleara 5-15h počinje promena neutrofila-citoplazme
---

7-12h Počinje promjena monocita-citoplastike  
8-10h Liza membrane limfocita počinje  
8-15h Neutrofil-Nuklearna promena počinje  
10-12h počinje promena eozinofila-citoplazme  
10-14h Eozinofil-Nuklearna promena počinje  
11-14h počinje promena limfocitne citoplazme  
12-15h Monocit - Nuklearna promena počinje  
14-17h Monocitna kompletna liza ćelijskog zida  
15h Limfociti - Nuklearna promena počinje  
18h Liza eritrocita  
18-20h Neutrofil-kompletna liza ćelijskog zida  
21h Ne mogu se prepoznati trombociti  
24-27h Vidljivi samo degenerirani limfociti

### Literatura

1. *Costa, I., Carvalho, F., Magalhães, T., Guedes de Pinho, P., Silvestre, R. and Dinis-Oliveira, R.J., 2015. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. Toxicology Research, 4(6), pp.1443-1452.*
2. *Davidov I.: Praktikum iz specijalne patološke morfologije. Novi Sad, 2018.*
3. *Donaldson, A.E. and Lamont, I.L., 2013. Biochemistry changes that occur after death: potential markers for determining post-mortem interval. PloS one, 8(11), p.e82011.*
4. *<http://patologija.vet.bg.ac.rs/> (pristupio 23.07.2020.)*
5. *Kalra, J., Mulla, A. and Kopargaonkar, A., 2016. Diagnostic value of vitreous humor in postmortem analysis. SM Journal of Clinical Pathology, 1(1), p.1005.*
6. *Kundu, S. D., & Dutta, S. S. 2017. Changes in Haemogram in Subjects after Death As A Tool to estimate Time Passed Since Death. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSRJDMS), 16(10), 19-27.*
7. *Sachdeva, N., Rani, Y., Singh, R. and Murari, A., 2011. Estimation of Post-Mortem interval from the changes in Vitreous Biochemistry. Journal of Indian Academy of Forensic Medicine, 33(2), pp.171-174.*
8. *Schoning, P. and Strafuss, A.C., 1980. Postmortem biochemical changes in canine cerebrospinal fluid. Journal of Forensic Science, 25(1), pp.60-66.*

## **PRIMENA SINTETSKIH I PRIRODNIH PROSTAGLANDINA POSLE TELJENJA I POJAVA ENDOMETRITISA KOD KRAVA SA ZAOSTALOM POSTELJICOM**

Srđan Todorović, Ivan Stančić, Ivan Galić, Ružić Zoran, Ivana Lakić

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad*

*Kontakt: [srdjan.todorovic28@gmail.com](mailto:srdjan.todorovic28@gmail.com)*

### **Sažetak**

Zaostajanje posteljice predstavlja značajan zdravstveni problem krava u puerperijumu. Cilj ovog rada je da utvrdi postoji li uticaj aplikacije prirodnih i sintetskih analoga PGF2 $\alpha$  11.dana postpartalno na pojavu kliničkog endometritisa i parametre reproduktivne efikasnosti kod krava sa zaostalom posteljicom. Ispitivanje je izvršeno na tri grupe od po 11 krava, prvoj oglednoj grupi je aplikovan kloprostenol, drugoj oglednoj grupi dinoprost a treća grupa je bila kontrolna. Rezultati su pokazali najmanju pojavu kliničkog endometritisa u grupi tretiranoj dinoprostom, dok su krave u kontrolnoj i grupi tretiranoj kloprostenolom imale sličan procenat pojave kliničkog endometritisa. Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da upotreba prirodnog analoga PGF2 $\alpha$  (dinoprosta) 11.dana od teljenja može uticati na smanjivanje pojave kliničkog endometritisa kod krava sa zaostalom posteljicom, što se ne može zaključiti kod upotrebe sintetskog analoga PGF2 $\alpha$  (kloprostenola).

Ključne reči: dinoprost, kloprostenol, zaostajanje posteljice, reprodukcija, krave

### **Uvod**

Smanjenje plodnosti predstavlja jedan od najznačajnijih problema mlečnog govedarstva danas. Negativan uticaj na plodnost imaju brojni zdravstveni poremećaji od kojih je zaostala posteljica (ZP) veoma značajan (Tagesu A., 2018; Beagley i sar., 2010; Dobranić i sar., 2006). Većina autora smatra da goveda izbace posteljicu u roku od 12 do 24 satia nakon teljenja, ukoliko ne dodje do izbacivanja u ovom periodu, dolazi do zaostajanja posteljice (Gonçalves i sar., 2019; Attupuram i sar., 2016; Drillich i sar., 2006). Učestalost ovog poremećaja prema Rooh i sar. (2013) varira od 4,0 do 16,1%, u radu Donevski i sar. (2016) se navodi da incindecija može biti i do 40%. Goveda imaju kotiledonarni tip placente, što znači da su fetalni kotiledoni pričvršćeni i omotavaju karunkule majke, stvarajući posteljicu. Spajanje kotiledona i karunkula se vrši pomoću mikrovila sastavljenih od kolagenih vlakana, a raspadanje ovog kolagena verovatno je ključni faktor u odvajanju placente (Abdisa, 2018). Smatra se da su uzroci nastanka zaostale posteljice su multifaktorijalni od koji su neki: indukovan porođaj, pobačaj, blizanački graviditet, teško teljenje, carski rez, nutritivni deficiti vitamina E, selen i karotena, zatim infektivni uzročnici poput virusa govede virusne dijareje i govedeg herpesvirusa 4 (Beagley i sar., 2010; Sheldon i sar., 2009). Oksitocin i prostaglandini stvaraju snažnu kontrakciju mišića materice (Fuchs i sar., 2001). Prostaglandin inicira kontrakcije miometrijuma i rezultira lizom corpus luteum-a (CL). Liza CL-a dovodi do izlučivanja relaksina i daljeg pada nivoa progesterona, što stimuliše aktivnost kolagenaze. Za razliku od relaksina, progesteron inhibira aktivnost kolagenaze i stimuliše mirovanje miometrijuma (Abdisa, 2018). Istraživanja vršena posljednjih godina ukazuju na postojanje imunološke osnove zadržanih fetalnih membrana. Sazrevanje posteljice i odvajanje od zdravih karunkula zavisi od nekompatibilnosti između majke i fetusa na nivou epitela. Aktiviraju se neutrofili unutar placentoma, razbijajući kolagen unutar horionskih vila i pomažući u odvajanju od karunkula. Faktori koji utiču na normalno sazrevanje posteljice uključuju smanjen oksidativni stres, niži odnos prostaglandina E (PGE2) u odnosu na prostaglandin F (PGF2 $\alpha$ ) unutar fetomaternih spojeva placentoma, zatim povećan nivo receptora za steroidne hormone i proces apoptoze koja nastaje u horionskom epitelu pre teljenja (Attupuram i sar., 2016; McNaughton i Murray, 2009).

Koncentracija PGF2 $\alpha$  kod krava sa zaostalom posteljicom je niža od koncentracije u zdravih krava (Takagi i sar., 2002). PGF2 $\alpha$  ne uzrokuje odvajanje zadržane posteljice, ali može poboljšati reproduktivne performanse kod krava nakon porođaja zbog uterokinetičkog efekta (Abdisa, 2018). Prostaglandini uzrokuju kontrakcije materice smanjenjem propusnosti membrane i povećanjem koncentracije unutar ćelijskog kalcijuma, osim toga oni regulišu ekspresiju oksitocinskih receptora u materici što podstiče kontraktilnost (Cuppert i sar., 2013; Papich, 2016). Neki autori smatraju da se zadržavanje posteljice dešava upravo zbog smanjenja neutrofilne aktivnosti i smanjenog imunog odgovora u prepartalnom periodu (Gonçalves i sar., 2019). Osim navedenog uticaja zaostale posteljice utvrđeno je i da krave s metaboličkim bolestima mogu imati smanjenu kontraktilnost materice, što smanjuje eliminaciju lohija, utičući na funkciju neutrofila i uzrokujući smanjenje plodnosti (Paiano i sar., 2019). Cilj ovog istraživanja je da utvrdi postoji li uticaj aplikacije prirodnih i sintetskih analoga PGF2 $\alpha$  11.dana postpartalno na pojavu kliničkog endometritisa i parametre reproduktivne efikasnosti kod krava sa zaostalom posteljicom.

### **Materijal i metode**

Ispitivanje je izvršeno na ukupno 33 oteljene krave holštajn-frizijske rase na jednoj farmi, starosti 2 do 6 godina, podeljenih u 3 grupe po 11 životinja. Životinje iz sve tri grupe su hranjene obrokom iste recepture i boravile su u istim zoohigijenskim uslovima u skladu sa tehnološkim standardom farme. Nakon 24 sata od porođaja su klinički pregledane u cilju dijagnostike zastajanja posteljice. Nalaz zaostalih posteljica je evidentiran nakon čega je započeto lečenje. Korišćen je sledeći terapijski protokol: svakoj životinji sa zaostalom posteljicom je izvršen antibiotski tretman subkutanom aplikacijom ceftiofura (Cevaxel-RTU®, proizvođač Ceva Sante Animale, Francuska) u dozi od 1000 mg, u toku 5 dana. Vršena je manuelna ekstrakcija zaostale posteljice na način da se na svaka 2 dana posteljica pokušavala odstraniti uz minimalnu upotrebu sile. Nakon ekstrakcije posteljice izvršen je i lokalni antibiotski tretman sa 2 g oksitetraciklin hidroklorida, (Geomycin® F, proizvođač Genera D.D., Hrvatska). U dve ogledne grupe (grupa B i C) po 11 krava sa zaostalom posteljicom izvršena je intramuskularna aplikacija prostaglandina PGF2 $\alpha$  11. dana postpartalno. Prvoj oglednoj grupi (grupa B) je aplikovan kloprostenol (Alfaglandin C®, proizvođač Alfasan International B.V., Holandija), sintetski analog PGF2 $\alpha$  u dozi od 0.5 mg kloprostenola ili 2 ml leka. Kravama u drugoj oglednoj grupi (grupi C), isti dan aplikovan je 25 mg prirodnog prostaglandina, dinoprost (Enzaprost T®, proizvođač Ceva Sante Animale, Francuska). Kontrolnu grupu (grupa A) je činilo 11 krava koje nisu tretirane prostaglandinima u postapartalnom periodu. Oko 4 nedelje nakon teljenja izvršen je klinički pregled transrektalnom palpacijom reproduktivnih organa u cilju dijagnostike patoloških promena. Praćenje involucije materice izvršeno je na osnovu njene veličine, debljine zidova, simetrije rogova, nalaza sadržaja u lumenu i prisustva vaginalnog iscedka. Procena stanja i veličine materice je merena modifikovano prema Paianu i sar. (2019): maternica koja staje u šaku, čiji su rogovi simetrični, bez palpacije sadržaja u lumenu i nije uočen zamućen ili purulentan iscedak iz vulve je evidentirana kao materica bez oboljenja. S druge strane nalaz uvećane materice, zadebljanih zidova, asimetrije rogova, nalaz sadržaja u lumenu i prisustvo zamućenog iscedka iz vulve je dijagnostikovano kao endometritis. Istovremeno je izvršen i pregled oba jajnika sa ciljem dijagnostike prisustva ili odsustva cikličkih funkcionalnih ovarijalnih struktura. Ukoliko je palpacijom nađena struktura koja odgovara folikulu ili žutom telu takvi jajnici su dijagnostikovani kao funkcionalni, dok je nalaz atrofičnih, glatkih jajnika i cistične degeneracije na jajnicima dijagnostikovano kao poremećaj cikličke aktivnosti. Praćeni su i servis period, indeks osemenjavanja i pojava prvog veštačkog osemenjavanja (V.O.) kao pokazatelji reproduktivne efikasnosti. Statistička obrada podataka za utvrđivanje oboljenja reproduktivnih organa vršena je deskriptivnom metodom i rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički, rezultati vezani za parametre reproduktivne efikasnosti su obrađeni statističkim programom R upotrebom analize varijanse (ANOVA) i Duncan-ovog testa za višestruka poređenja.



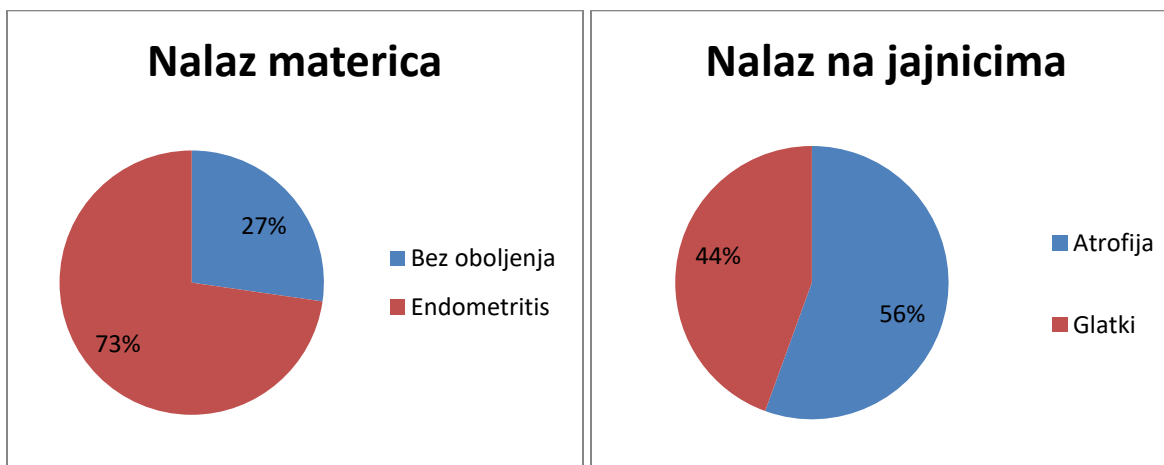
## Rezultati

U tabeli 1. se uočava da je pojava kliničkog endometritisa najmanja u ogleđnoj C grupi 45% (5 od 11), dok je najveći procenat krava sa kliničkim endometritisom bio kod krava u grupi B i iznosio je 82% (9 od 11). U kontrolnoj grupi pojava kliničkog endometritisa je bila 73% (8 od 11). U istoj tabeli i grafikonima od 1. do 6. se vidi i razlika u pojavi poremećaja ciklične aktivnosti jajnika, krave u kontrolnoj grupi su imale najveći procenat ovog poremećaja 100% (11 od 11), dok su krave u grupi B imale 82% (9 od 11) i krave u C grupi najmanji procenat poremećaja ciklične ovarijalne aktivnosti koji je iznosio 73% (8 od 11). Kliničkim transrektalnim pregledom reproduktivnih organa krava u ogledu dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 1. Rezultati ovog rada su pokazali najmanju pojavu kliničkog endometritisa u grupi tretiranoj dinoprostom, dok su krave u kontrolnoj i grupi tretiranoj kloprostamolom imale sličan procenat kliničkog endometritisa. Rezultati prikazani u tabeli 2. pokazuju srednje vrednosti praćenih parametara reproduktivne efikasnosti kod krava u ovom ogledu. Iako postoje razlike u srednjim vrednostima kod svih praćenih parametara upotrebom analize varijanse (ANOVA) i Duncan-ovog testa za višestruka poređenja je uočeno odsustvo statistički značajne razlike. Treba napomenuti da postoje velika pojedinačna variranja u rezultatima za sve praćene parametre kod krava u svim grupama što se može pripisati mnoštvu drugih faktora koji utiču na ove parametre.

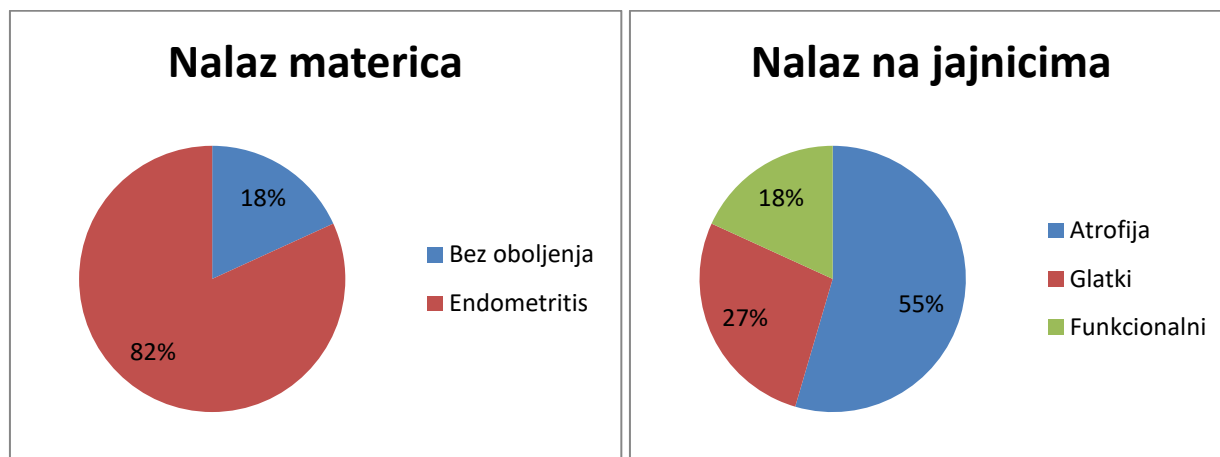
Tabela 1. Rezultati pregleda reproduktivnih organa

Grupa	Nalaz materica		Nalaz jajnici	
	Bez oboljenja	Endometritis	Funcionalni	Poremećaj ciklične aktivnosti
A	3 (27%)	8 (73%)	0 (0%)	11 (100%)
B	2 (18%)	9 (82%)	2 (18%)	9 (82%)
C	6 (55%)	5 (45%)	3 (27%)	8 (73%)

Grafikon 1. i 2. Prikaz nalaza na jajnicima i materici kod krava A grupe



Grafikon 3. i 4. Prikaz nalaza na jajnicima i materici kod krava b grupe



Grafikon 5. i 6. Prikaz nalaza na jajnicima i materici kod krava C grupe

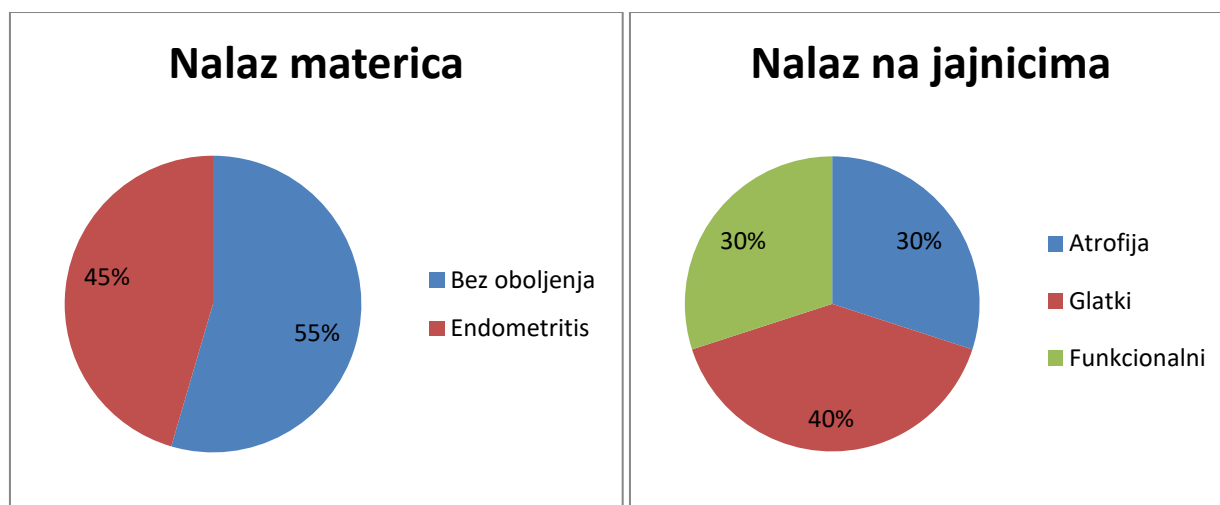


Tabela 2. Rezultati reproduktivnih parametara

Grupa	Servis period	Indeks osemenjavanja	Pojava prvog V.O .
A	228.72	3.27	124.72
B	169.54	2.72	97.81
C	164.90	2.36	116.27

### Diskusija

PGF2 $\alpha$  i sintetički analozi se naširoko koriste u reprodukciji goveda pri indukciji estrusa ili pobačaja i liječenju reproduktivnih poremećaja kao što su piometra, endometritisi i ciste na jajnicima. Dve

vrste proizvoda PGF2 $\alpha$  su komercijalno dostupne, dinoprost trometamin, so trometamina, odnosno prirodni PGF2 $\alpha$  i kloprostenol-natrijum, sintetski analog (Montaser i sar., 2016). U literaturi se mogu pronaći različiti rezultati uticaja aplikacije prostaglandina postpartalno kod krava sa zaostalom posteljicom. Rezultati eksperimenata Garcie i sar., (1992) ne podržavaju upotrebu prostaglandina u roku od jednog sata od indukovanog partusa u cilju smanjivanja pojave zadržavanja placente. U radu Takagi i sar. (2002) su objavili da nije bilo razlike u koncentracijama progesterona, estradiola-17 $\beta$ , u tkivima posteljice goveda kod krava sa i bez zaostale posteljice. Srednja koncentracija PGF2 $\alpha$  kod krava sa zaostalom posteljicom bila je niža od koncentracije u zdravih krava, na čemu se zasniva i naša hipoteza da bi aplikacija istog umanjila negativan efekat zaostale posteljice, isto su utvrdili i za koncentracije oksitocina i oksitocinskih receptora. Slični rezultati su objavljeni u istraživanju Horte i sar. (1986) koncentracije PGF2 $\alpha$  bile su značajno niže u krava sa zaostalom posteljicom nego u krava bez zaostale posteljice 60 minuta nakon partusa. Zabeležen je značajan porast nivoa PGF2 $\alpha$  između 30 i 60 minuta kod krava bez pojave zaostale posteljice, dok su u krava sa zaostalom posteljicom vrednosti PGF2 $\alpha$  ostale prilično konstantne tokom proučavanog razdoblja. PGF2 $\alpha$  ne uzrokuje odvajanje zadržane posteljice, ali može poboljšati reproduktivne performanse kod krava nakon porođaja zbog uterokinetičkog efekta (Abdisa, 2018). Brojni autori navode da zaostajanje posteljice rezultira endometritisom, tako Potter i sar. (2010) su dokazali pozitivnu korelaciju između zaostalih fetalnih membrana i kliničkog endometritisa. U istom radu autori navode da su faktori rizika za klinički endometritis povezani sa traumom ženskog genitalnog trakta i poremećajem fizičkih prepreka infekciji, a ne fekalnom kontaminacijom. Endometritis prouzrokuje usporavanje involucije materice, međutim brojni faktori mogu dovesti do usporene involucije, tako su Paiano i sar. (2019) su u svom istraživanju zaključili da su krave sa metaboličkim bolestima (hipokalcemija, ketoza i pojačana lipomobilizacija) imale su usporenu involuciju materice u poređenju sa kravama bez metaboličkih bolesti. Klinički endometritis je definisan kao cerviks  $\geq$  7,5cm u promeru transrektalnom palpacijom nakon 20 i više dana od partusa ili kao prisustvo mukopurulentnog ili purulentnog vaginalnog iscedka nakon 26 dana od partusa (Dubuc i sar., 2010). U istraživanju Hay i sar. (2019) je incidencija patološkog iscedka iz reproduktivnog trakta bila konzistentna sa kliničkim endometritisom (koji se smatra glavnim izvorom navedenog iscedka). Voelz i sar. (2018) objavljuju da je prevalencija patološkog vaginalnog iscedka bila 28,5%, kod prvotelki i 13,4% kod krava sa više teljenja. Subklinički endometritis je upala endometrija bez patološkog iscedka (Mrkun i sar., 2016). Prevalencija subkliničkog endometritisa u različitim studijama kreće se od 16 do 90 %, a studije o lečenju subkliničkog endometritisa pomoću PGF2 $\alpha$  ili njegovih analoga, intrauterinim antibioticima ili proteolitičkim enzimima pokazale su heterogene rezultate i zahtevaju dalja istraživanja (Lincke i sar., 2007). Giuliadori i sar. (2017) su ispitivali uticaj lečenja jednom dozom PGF2 $\alpha$  na reproduktivne performanse kod krava sa gnojnim vaginalnim iscedkom oko 30. dana postpartalno. Rezultati su pokazali da nizak uticaj na reproduktivne performanse, što je u skladu sa našim rezultatima. Slične rezultate su dobili i Borchardt i sar. (2018). Drugačije rezultate su dobili Etherington i sar. (1994) objavili su da tretman prostaglanidima između 24. i 30. dana postpartalno ima pozitivan uticaj na poboljšanje reproduktivnih parametara kod muznih krava. Ovaj uticaj se prvenstveno ogleda u skraćivanju intervala od teljenja do koncepcije. Čitaković i sar., (2013) su postigli najveći procenat izlečenja endometritisa kod krava lečenih sa 25 mg dinoprosta (93,30%), dok je kod druge dve grupe plotkinja lečenih lokalnom aplikacijom antiseptika rezultat bio značajno manji. Salasel i Mokhtari (2011) su pratili uticaj dvostruke aplikacije 25 mg dinoprosta, u razmaku od 8 sati, 20. dana nakon partusa. Hipoteza je bila da bi vreme druge doze imitiralo oslobađanje endogenog PGF2 $\alpha$  iz materice. Praćeni su sledeći reproduktivni parametri: pojava prvog estrusa, prvog veštačkog osemenjavanja, koncepcija, servis period, indeks osemenjavanja i procenat pobađanja. Njihovi rezultati pokazuju da je navedeni način aplikacije dinoprosta poboljšao reproduktivne performanse i smanjio učestalost pobađanja. Brojni autori su se bavili poređenjem efikasnosti dinoprosta i kloprostenola kod krava objavljujući različite rezultate. Postoji nekoliko oblika prostaglandina, ali se uglavnom koriste dva analoga, dinoprost (trometinski amin prirodnog PGF2 $\alpha$ ) koji ima kratak poluživot zbog brze inaktivacije oksidacijom nakon jednog prolaska kroz pluća i kloprostenol (sintetički analog) s dužim biološkim poluživotom (Stevenson i sar., 2010). Dinoprost trometamin ima kratak poluživot od oko 7 do 8 minuta. Kloprostenol natrijum je otporniji na

endogeni metabolizam i zadržava se u cirkulaciji duže vreme, oko 3 sata (Martins i sar., 2006). U poređenju sa kloprostenolom, dinoprost je efikasnije dovodio do lutealne regresije 69,1 naprema 78,5%, bez obzira na broj prisutnih CL. Vrednost koncepcije nije se razlikovala između dinoprosta (32,8%) i kloprostenola (31,3%) (Stevenson i sar., 2010). U jednoj studiji Pursley i sar. (2012) kod krava s funkcionalnim CL i tretiranih kloprostenolom nasuprot dinoprosta rezultiralo je većim perifernim koncentracijama estradiola. Za indukciju estrusa kloprostenolom indukovane krave su pokazivale znakove estrusa u 42,4% slučajeva naspram 34,0% u slučajevima gde je korišten dinoprost. Procenat koncepcije je bio viši u grupi kod koje je korišten kloprostenol (38,3%), dok je grupa gde je upotrebljen dinoprost imala koncepciju od 34,4%. Slične rezultate objavili su Montaser i El-Desouky (2016). Nešto drugačije rezultate su objavili Baryczka i sar. (2018), ispitivali su učinkovitost jednokratnog tretmana kloprostenolom ili dinoprostom na reproduktivne performance kod krava i zaključili da razlika nije bila statistički značajna. Distribucija uočenih estrusa nije se razlikovala između kloprostenola i dinoprosta. Nije bilo značajne razlike između kloprostenola i dinoprosta ni u koncepciji (65,2% prema 66,2%). Vredi istaći i da je utvrđeno je da se luteoliza pomoću PGF2 $\alpha$  nemože postići kod žutih tela mlađih od 5 dana (Valdecabres-Torres i sar., 2012; Tsai i Wiltbank, 1998). Manjak PGF2 $\alpha$ -indukovane luteolize u mladom CL-u može biti posledica specifičnih promena u ekspresiji gena, posebno PGHS-2, koje mogu sprečiti intralutealnu proizvodnju PGF2 $\alpha$  i eventualno druge ključne luteolitičke procese (Tsai i sar., 1998). Valdecabres-Torres i sar. (2012) su objavili da aplikacija veće doze d-kloprostenola (300  $\mu$ g u odnosu na 150  $\mu$ g) dovodi do pune luteolize, brže se postiže ovulacija i niža koncentracija progesterona. Kad je u pitanju izbor terapije zaostale posteljice navodi se da u Drillich i sar. (2005) poredili dve različite strategije u lečenju zadržane placente kod muznih krava. Svim kravama sa zadržanom placentom izvršen je lokalni antibiotski tretman uz manuelnu ekstrakciju fetalnih membrana. Krave u ogednoj grupi dodatno su tretirane s 4 mg analoga prostaglandina F2 $\alpha$ , intramuskularno svaki dan uz lokalno lečenje antibioticima. U kontrolnoj grupi krave nisu primale tretman etiprostonom. Uspeh lečenja meren je vremenom izbacivanja fetalnih membrana, pojavom akutnog metritisa i hroničnog endometritisa, kao i reproduktivnim rezultatima krava. Vreme od teljenja do izbacivanja fetalnih membrana u ogednoj grupi je iznosio 4,5 dana, u kontrolnoj grupi 7 dana, učestalost akutnog metritisa je iznosila 61,5% u ogednoj i 71,4% kod krava u kontrolnoj grupi. Pojava hroničnog endometritisa u trećoj sedmici nakon teljenja nije pokazala značajne razlike između krava u kontrolnoj i ogednoj grupi. Rezultati njihove studije nisu pokazali pozitivan učinak etiprostona primenjenog u ranom postpartalnom period kod krava sa zadržanom posteljicom na brzinu izlečenja i reproduktivne rezultate (Drillich i sar., 2005). Dokazano je da su krave lečene intrauterinim obletama nakon zaostajanja placente ostale gravidne ranije i imale su bolji procenat koncepcije u odnosu na krave lečene manuelnim vađenjem placente (Đuričić i sar., 2011). S druge strane brojni radovi ukazuju da lokalni tretman antibioticima i ručno uklanjanje zadržane posteljice ili kombinacija oboje, nisu dovodili do poboljšanja kliničkog toka ni do boljih reproduktivnih performansi u poređenju sa sistemskim lečenjem antibioticima (Drillich i sar., 2006). Kod krava sa metritisom autori su postigli bolje uterokinetičke efekte sa oksitocinom nego sa dinoprostom (Heppelmann i sar., 2018).

### Zaključak

Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da upotreba prirodnog analoga PGF2 $\alpha$  (dinoprosta) 11.dana od teljenja može uticati na smanjivanje pojave kliničkog endometritisa kod krava sa zaostalom posteljicom, što se ne može zaključiti kod upotrebe sintetskog analoga PGF2 $\alpha$  (kloprostenola). Upotreba sintetskih i prirodnih prostaglandina 11. dana postpartalno nije pokazala značajan uticaj na dužinu servis perioda, vrednosti indeksa osemenjavanja i pojavu prvog veštačkog osemenjavanja. S obzirom na praktičan značaj i dobijene rezultate, kao i različite podatke u literaturi potrebna su dalja istraživanja o ovoj naučnoj problematici s ciljem pronalaženja rešenja za posledice zaostale posteljice kod krava.

**Literatura**

1. Abdisa, T. (2018): *Mechanism of retained placenta and its treatment by plant medicine in ruminant animals in Oromia, Ethiopia. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 10(6): 135-147
2. Attupuram N.M., Kumaresan A., Narayanan K., Kumar H.(2016): *Cellular and molecular mechanisms involved in placental separation in the bovine: A review. Mol Reprod Dev. Vol. 83(4):287-297*
3. Baryczka A., Barański W., Nowicki A., Zduńczyk S., Janowski T. (2018): *Effect of single treatment with cloprostenol or dinoprost on estrus and reproductive performance in anestrous dairy cows after service. Pol J Vet Sci. Vol.21(2):383-387*
4. Beagley J.C., Whitman K.J., Baptiste K.E., Scherzer J.(2010): *Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. J Vet Intern Med. Vol. 24(2):261-268*
5. Borchardt S., Ludwig S., Heuwieser W.(2018): *Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of prostaglandin F<sub>2α</sub> to treat purulent vaginal discharge in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. Vol.101(12):11403-11412*
6. Cuppett C. D., Caritis S.N.(2013): *19 - Uterine Contraction Agents and Tocolytics, Editor(s): Donald R. Mattison, Clinical Pharmacology During Pregnancy, Academic Press, 307-330*
7. Čitaković V., Vakanjac S., Maletić M., Đurić M.(2013): *Uparedno ispitivanje različitih postupaka terapije hroničnih endometritisa na tok kliničkog izlječenja i plodnost krava. naučni simpozijum Reprodukcijska domaćih životinja, Divčibare, Srbija, 10-13.oktobar, Zbornik predavanja, str.171-176*
8. Dobranic T., Samardžija M., Prvanovic N., Makek Z., Molek K. (2006): *The influence of retained placenta on insemination index in Simmental cows , Proc. 8th consulting of clinical pathology and therapy with international participation. Clinica Veterinaria, Neum, Bosna i Hercegovina, 107- 13.*
9. Donevski T., Trojačanec P., Atanasov B., Nikolovski M., Donevska M., Petkov V.(2016): *Zadržavanje posteljice kod mlečnih krava, 7. naučni simpozijum Reprodukcijska domaćih životinja, Divčibare, Srbija, 6-9.oktobar, Zbornik predavanja, str.21-30*
10. Drillich M., Mahlstedt M., Reichert U., Tenhagen B.A., Heuwieser W. (2006): *Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows. J. Dairy sci. Vol. 89(2): 627-35*
11. Drillich M., Schroder A., Tenhagen B.A. (2005): *Efficacy of a treatment of retained placenta in dairy cows with prostaglandin F<sub>2α</sub> in addition to a local antibiotic treatment. Dtsch Tierarztl Wochenschr. Vol. 112(5): 174-179*
12. Dubuc J., Duffield T.F., Leslie K.E., Walton J.S., LeBlanc S.J.(2010): *Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. J. Dairy Sci., Vol. 93: 5225-5233*
13. Djuricic D., Vince S., Grizelj J., Dobranic T., Lipar Marija., Samardžija M.(2011): *Influence of different therapy approaches - with or without manual extraction - of retained placenta on reproductive performance in Simmental cows. Acta Veterinaria. Vol. 61( 5-6): 599-608*
14. Etherington W.G., Kelton D.F., Adams J.E.(1994): *Reproductive performance of dairy cows following treatment with fenprostalene, dinoprost, or cloprostenol between 24 and 31 Days post partum: A field trial, Theriogenology, Vol. 42(5): 739-752*
15. Fuchs A.R., Ivell R., Ganz N., Fields M.J., Gimenez T. (2001): *Secretion of oxytocin in pregnant and parturient cows: corpus luteum may contribute to plasma oxytocin at term. Biology of Reproduction, Vol. 65(4):1135-1141*
16. Garcia A., Barth A.D., Mapletoft R.J.(1992): *The effects of treatment with cloprostenol or dinoprost within one hour of induced parturition on the incidence of retained placenta in cattle. Can. Vet. J. Vol. 33(3):175-183*
17. Giuliadori M.J., Magnasco M., Magnasco R.P., Lacau-Mengido I.M., de la Sota R.L.(2017): *Purulent vaginal discharge in grazing dairy cows: Risk factors, reproductive performance, and prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment. J. Dairy Sci. Vol.100(5):3805-3815*
18. Gonçalves R.M., Guagnini F.D., Storck D.J., Brose M.D., Gonzáles F.H., Dalto, A.G. (2019): *Risk factors associated to retained placenta in holstein cows. Acta Scientiae Veterinariae, 47: 1651.*
19. Hay M.J., Gunn A.J., Abuelo A., Brookes V.J.(2019): *The Effect of Abnormal Reproductive Tract Discharge on the Calving to Conception Interval of Dairy Cows. Front Vet Sci.;6:374*
20. Heppelmann M., Volland J., Pfarrer C., Kietzmann M., Baumer W., Merbach S., Schoon H.-A., Wellnitz O., Schmicke M., Hoedemaker M., Bollwein H.(2018): *Effects of oxytocin and PF<sub>2α</sub> on uterine contractility in cows with and without metritis -An in-vitro study, Animal Reproduction Science, Vol. 188: 144-154*
21. Horta A.E., Chassagne M., Brochart, M. (1986): *Prostaglandin F<sub>2α</sub> and prostacyclin imbalance in cows with placental retention: new findings. Annales de recherchesveterinaires. Annals of veterinary research. Vol. 17(4): 395-400*

22. Lincke A., Drillich M., Heuwieser W.(2007): *Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility--a review of recent publications. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. Vol. 120(5-6):245-250*
23. Martins J.P.N., Policelli R.K., Neuder L.M., Raphael W., Pursley J.R.(2011): *Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 $\alpha$  of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. J. Dairy Sci., Vol.94(6): 2815-2824*
24. McNaughton A.P., Murray R.D.( 2009): *Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. Vet Rec. Vol. 165(21):615-622*
25. Montaser A. M., El-Desouky A. M.(2016): *Effect of DinoprostTromethamine, Cloprostenol and d-CloprostenolonProgesterone Concentration and Pregnancy in Dairy Cattle. Journal of Agriculture and Veterinary Science. Vol. (9) 2: 64-67*
26. Mrkun J., Kosec M., Klobučar I.(2016): *Endometritis i funkcija jajnika u toku puerperijuma kod krava, 7. naučni simpozijum Reprodukcijski domaćih životinja, Divčibare, Srbija, 6-9.oktobar, Zbornik predavanja, str. 49-54*
27. Paiano R.B., Birgel D.B., Junior E.H. (2019): *Uterine involution and reproductive performance in dairy cows with metabolic diseases. Animals: an Open Access Journal from MDPI, 9:93*
28. Papich M.G. (2016): *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition), W.B. Saunders, ,Pp. 250-251*
29. Potter T.J., Guitian J., Fishwick J., Gordon P.J., Sheldon I.M.(2010): *Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. Theriogenology. Vol. 74(1):127-134*
30. Pursley J.R., Martins J.P., Wright C., Stewart N.D.(2012): *Compared to dinoprosttromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. Theriogenology. Vol. 78(4):823-829*
31. Rooh U.I. A., Bhat G.R., Ahmad A., Sarathi Swain P., Arunakumari G.(2013): *Understanding patho-physiology of retained placenta and its management in cattle. Veterinary Clinical Science, Vol. 1(1): 01-09*
32. Salasel B., Mokhtari A.(2011):*Effect of early postpartum PGF2 $\alpha$  treatment on reproductive performance in dairy cows with calving and puerperal traits, Theriogenology, Vol. 76(9): Pp. 1723-1729*
33. Stevenson J.S., Phatak A.P.(2010): *Rates of luteolysis and pregnancy in dairy cows after treatment with cloprostenol or dinoprost. Theriogenology. Vol.73(8):1127-38*
34. Sheldon I.M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H-J.(2009): *Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. Biology of Reproduction. Vol. 81(6): 1025–1032*
35. Takagi M., Fujimoto S., Ohtani M., Miyamoto A., Wijagunawardane M.P.B., Acosta T.J., Miyazawa K., Sato K.( 2002): *Bovine Retained Placenta: Hormonal Concentrations in Fetal and Maternal Placenta, Placenta, Vol. 23(5): 429-437*
36. Tsai S.J., Wiltbank M.C.(1998):*Prostaglandin F2 $\alpha$  regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. Biol. Reprod., Vol. 58 pp. 346-352*
37. Valldecabres-Torres X., García-Roselló E.,García-Muñoz A., Cuervo-Arango J.(2012): *Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea, Journal of Dairy Science, Vol. 95(8): 4389-4395*
38. Voelz B.E., Rocha L., Scortegagna F., Stevenson J.S., Mendonça L.G.D.(2018): *Response of lactating dairy cows with or without purulent vaginal discharge to gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 $\alpha$ . J. Anim Sci. Vol. 96(1):56-65.*

## **SREDNJELANČANE MASNE KISELINE U ZAŠTITI KRAVA OD MASTITISA**

Srđan Krnjaić

*Elixirfeed*

Kontakt: [Srdjan.Krnjaic@elixirfeed.rs](mailto:Srdjan.Krnjaic@elixirfeed.rs)

### **Sažetak**

Mastitis predstavlja veliki ekonomski problem na farmama i spada u jedan od tri najznačajnija problema koja postoje na farmama (pored metaboličkih problema i problema reprodukcije). Zbog toga su patološke i patofiziološke osnove mastitisa uvek bile zanimljiva tema za istraživače. Održavanje imunološkog sistema i očuvanje funkcionalnog statusa leukocita u borbi protiv uzročnika mastitisa predstavlja značajan mehanizam za očuvanje mlečne žlezde koja je zahvaćena ovim inflamatornim problemima. U našem istraživanju koirstili smo Aromabiotic Cattle koji je pažljivo izbalansirana mešavina masnih kiselina srednjeg lanca - MCFA-e koja se koristi kao funkcionalni dodatak u ishrani goveda. Na osnovu naučne literature i strogo kontrolisanih eksperimenata pokazano je da ovaj preparat omogućuje: Poboljšanje imuniteta – kvalitet neutrofila, Priprema mlečnu žlezdu za laktaciju i uticaj na zdravlje vimena, Smanjenje broja somackih ćelija, Povećava kvalitet i količinu mlečnih proteina i masti., • Smanjuje rizik od acidoze buraga zbog povišene vrednosti pH. Preparat je aplikovan na jednoj farmi krava u Banatu. Ogled je vršen u period kasnog proleća, a vršene su detaljne analize mleka. U nastavku su dobijeni rezultati. Osnovni nalaz je da promena broja somatskih ćelija u poslednjoj nedelji u odnosu na prvu nedelju (logaritmovane vrednosti,  $5,6=400.000$ ;  $5,29=200.000$  ćelija; jedna krava isključena iz ogleda). Pad se vidi kod 14 od 39 krava. Apsolutni učinak preparata u ovoj populaciji je na 36% ispitivanih krava. Kod 11 od 29 krava se vidi porast broja somatskih ćelija, ali takav da on ima protektivnu ulogu (opseg 100-200 hiljada). Kod krava koje su ogled započele sa optimalnim brojem somatskih ćelija, broj somatskih ćelija se zadržavao na istom nivou tokom svih nedelja ogleda, sa verovatnoćom od 65-95%. Ključne reči: mastitis, masne kiseline, krave, prevencija.

### **Srednjelančane masne kiseline, vijabilnost leukocita i mastitis**

Mastitis predstavlja veliki ekonomski problem na farmama i spada u jedan od tri najznačajnija problema koja postoje na farmama (pored metaboličkih problema i problema reprodukcije). Zbog toga su patološke i patofiziološke osnove mastitisa uvek bile zanimljiva tema za istraživače. Održavanje imunološkog sistema i očuvanje funkcionalnog statusa leukocita u borbi protiv uzročnika mastitisa predstavlja značajan mehanizam za očuvanje mlečne žlezde koja je zahvaćena ovim inflamatornim problemima.

Mehrzađ i sar. (2004,2005) su ispitali vijabilnost neutrofila u odnosu na ozbiljnost koliformnog mastitisa: Da bismo proučavali interakcije domaćin-patogen tokom mastitisa *Escherichia coli*, prvo smo utvrdili da li će infekcija *E.coli* promeniti hemiluminescenciju (CL) krvi i mleka polimorfonuklearnih neutrofila (PMN). Zatim smo pretpostavili da bi, kada *E.coli* napadne mlečnu žlezdu, održivi PMN u mleku efikasno fagocitizirao i uništio *E.coli* pre uspostavljanja infekcije. Primetili smo da su zavisni od fagocitoze i nezavisni CL usko povezani sa održivošću PMN-a i bili su presudni za ishod mastitisa. Maksimalni priliv PMN i jedinice za formiranje kolonija u zaraženim četvrtima pojavili su se u postinfekcionim satima (PIH) 6 do 24. Ovo je dodatno pojačalo regrutovanje PMN kroz barijeru koštane srži i krvi, kao i barijeru krv-mleko. Preživljavanje regrutovanih PMN u četvrtima zaraženim *E.coli* bilo je mnogo veće od preživljavanja u neinficiranim četvrtima. Aktivnost hemiluminescencije PMN-a iz zaraženih četvrtina značajno se povećala nakon infekcije *E.coli*, čak premašujući onu u krvi na PIH 6, 12 i

18 do 24; nije zabeležen takav porast u neinficiranim četvrtima, što sugerira da su različiti odgovori mlečnog PMN-a na stimulse uglavnom proizašli iz održivosti PMN-a. Najveći intenzitet i trajnost CL zabeleženi su u mleku PMN iz zaraženih četvrti na PIH 12. Dok je povećana održivost PMN u neinficiranim četvrtima bila značajna samo na PIH 6, održivost PMN u zaraženim četvrtima bila je dugotrajna i znatno veća na PIH 6 do 72. Važno je da je veća održivost PMN mleka u preinfekciji korelirala sa klirensom bakterija, što je praćeno bržim oporavkom. Naša studija snažno podržava hipotezu da bi jačanje održivosti PMN mleka moglo biti strategija kojom se sprečava ili smanjuje težina koliformnog mastitisa kod mlečnih krava. Ova strategija se može postići jačanjem funkcionalnosti koštane srži.

Piepers i DeVliegher (2013) su vršili oralnu aplikaciju srednjelančanih masnih kiselina kod krava tokom zausešnja kako bi ispitali da li ove masne kiseline imaju ulogu u očuvanju viabilnosti neutrofila u peripartalnom periodu, čime bi se ispitala mogućnost korišćenja srednjelančanih masnih kiselina u procesu zaštite imunoloških ćelija tokom perioda posle teljenja kada je imunosupresija prirodno izražena i postoji rizik od mastitisa. Randomizirano kliničko ispitivanje sprovedeno je kako bi se istražio efekat oralno dopunjenih masnih kiselina srednjeg lanca (MCFA) na junice i krave počev 6-8 nedelja pre očekivanog datuma teljenja na apoptozu polimorfonuklearnih neutrofilnih leukocita krvi i mleka (PMNL) između 1 i 3 d u mleku (DIM). Takođe su procenjeni efekti suplementacije MCFA na verovatnoću intramamarnih infekcija (IMI) u ranoj laktaciji i broja somatskih ćelija u testnom danu (SCC) i prosečne dnevne mlečnosti (MI) tokom prvih 4 meseca laktacije. Uključene su 22 životinje, od kojih je polovina oralno dodata MCFA, počev od 6-8 nedelja pre teljenja, a polovina je služila kao nedodvojena kontrola. Izvodljivost PMNL i u krvi i u mleku je kvantifikovana primenom dvobojne protočne citometrije sa aneksinom i propidijum jodidom obeleženim fluoresceinom. Kod životinja koje se ne dohranjuju, % apoptoze PMNL u krvi značajno se povećao između početka suplementacije i rane laktacije, što odražava potencijalno smanjenje urođenog imunološkog kapaciteta, dok to nije tačno kod životinja sa MCFA-dopunom. Slični rezultati su primećeni i kod apoptoze PMNL mleka. Sve u svemu, % apoptotskog mleka PMNL između 1 i 3 DIM je značajno niži u grupi sa MCFA-dopunom u poređenju sa grupom koja nije dodavana. Nije bilo značajnog efekta oralne suplementacije MCFA na verovatnoću kvartala IMI niti na kompozitni SCC mleka za testni dan ili prosečni dnevni MI. U zaključku, oralno dodavanje MCFA, započeto 6-8 nedelja pre očekivanog datuma teljenja, podržavalo je održivost krvi i mlečnih neutrofila kod ranih mlečnih krava u laktaciji. Ipak, to se nije odrazilo na poboljšanje zdravlja vimena niti MI u ranoj i kasnijoj laktaciji. Rezultati bi trebalo da pokrenu istraživanje kako bi se dalje razotkrili mehanizmi koji stoje iza primećenog imunomodulirajućeg efekta i potencijalnog značaja za performanse krava tokom laktacije.

Novija istraživanja (Laloučková i sar., 2019) su pokazala da u in vitro uslovima palmino ulje bogato srednjelančanim masnim kiselinama pomaže u borbi protiv gram-pozitivnih bakterija. Razni patogeni koji uzrokuju mastitis kod mlečnih goveda ozbiljno su zabrinuti zbog njihove povećane antibakterijske rezistencije i potencijalnog prenosa na druge krave, telad i životnu sredinu, posebno kroz proces mužnje. Zbog toga su prijeko potrebni alternativni pristupi upotrebi antimikrobnih sredstava u liječenju ili kontroli mastitisa kod muznih goveda. Poznato je da je antibakterijski efekat masnih kiselina srednjeg lanca (MCFA) značajan za različite patogene, ali postoje samo ograničene informacije o aktivnosti MCFA na patogene koji izazivaju mastitis. Štaviše, u trenutnoj literaturi se ne mogu naći dokazi o antimikrobnim efektima palmnog ulja bogatog MCFA, kao što su kokos, jezgra palme i ulje tukume. Cilj ove studije bio je da se proceni in vitro antibakterijski efekat palmovih ulja bogatih MCFA, nakon cepanja egzogenom lipazom iz *Mucor javanicus*, na sojeve koji uzrokuju mastitis goveda (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*) metodom mikrodilucije. Sva testirana palmna ulja pokazala su antibakterijsku aktivnost protiv osam testiranih sojeva bakterija u rasponu od 64–8192  $\mu\text{l} / \text{ml}$  sa *Str.agalactiae* je najosetljivija, a *S.aureus* najotpornija vrsta. Rezultati ove studije pokazuju da palmino ulje bogato MCFA može da posluži kao alternativa pretežno korišćenim predip i postdip postupcima u kontroli govedeg mastitisa, ali su potrebne dalje in vivo studije kako bi se potvrdili nalazi za njihove moguće primene.



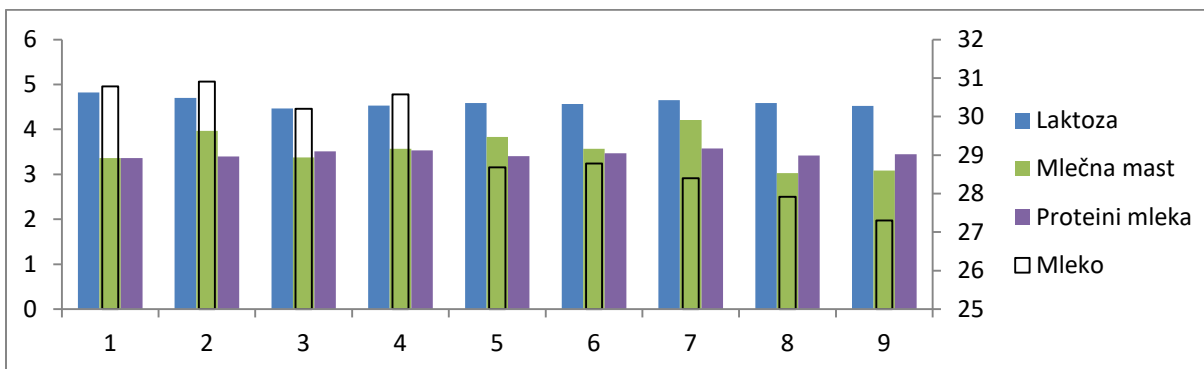
### Primena preparata na bazi mešavine masnih kiselina srednjeg lanca

U našem istraživanju koirstili smo Aromabiotic Cattle koji je pažljivo izbalansirana mešavina masnih kiselina srednjeg lanca - MCFA-e koja se koristi kao funkcionalni dodatak u ishrani goveda. Na osnovu naučne literature i strogo kontrolisanih eksperimenata pokazano je da ovaj preparat omogućuje:

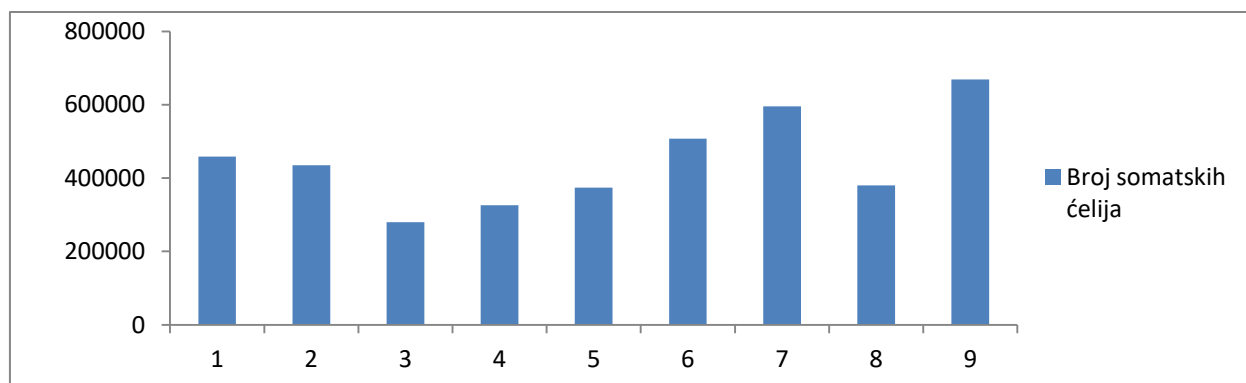
- Pобољшanje imuniteta – kvalitet neutrofila.
- Priprema mlečnu žlezdu za laktaciju i uticaj na zdravlje vimena,
- Smanjenje broja somackih ćelija,
- Povećava kvalitet i količinu mlečnih proteina i masti.,
- Smanjuje rizik od acidoze buraga zbog povišene vrednosti pH.

Preparat je aplikovan na jednoj farmi krava u Banatu. Ogled je vršen u period kasnog proleća, a vršene su detaljne analize mleka. U nastavku su dobijeni rezultati. Osnovni nalaz je da promena broja somatskih ćelija u poslednjoj nedelji u odnosu na prvu nedelju (logaritmovane vrednosti,  $5,6=400.000$ ;  $5,29=200.000$  ćelija; jedna krava isključena iz ogleda). Pad se vidi kod 14 od 39 krava. Apsolutni učinak preparata u ovoj populaciji je na 36% ispitivanih krava. Kod 11 od 29 krava se vidi porast broja somatskih ćelija, ali takav da on ima protektivnu ulogu (opseg 100-200 hiljada). Kod krava koje su ogled započele sa optimalnim brojem somatskih ćelija, broj somatskih ćelija se zadržavao na istom nivou tokom svih nedelja ogleda, sa verovatnoćom od 65-95%.

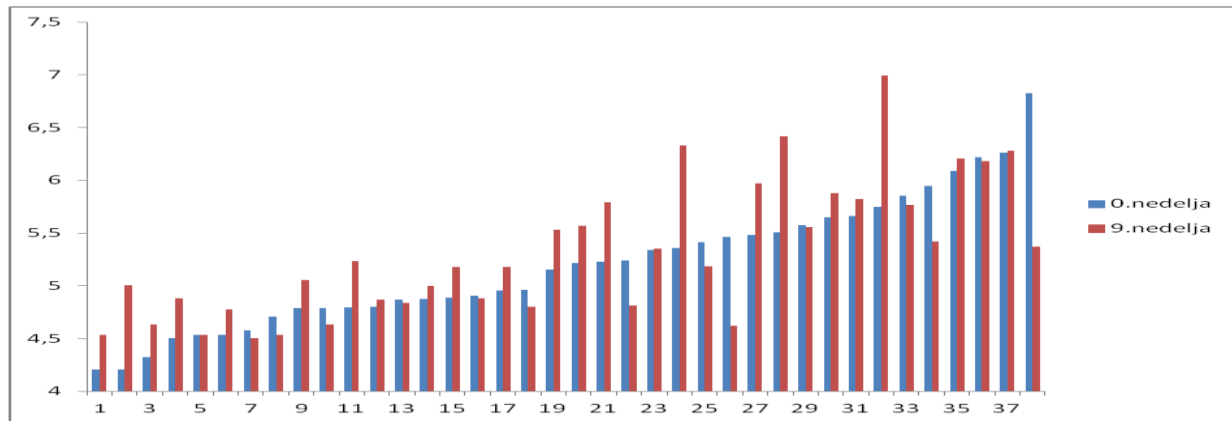
Grafični prikaz srednjih vrednosti proizvodnje mleka i hemijskog sastava mleka



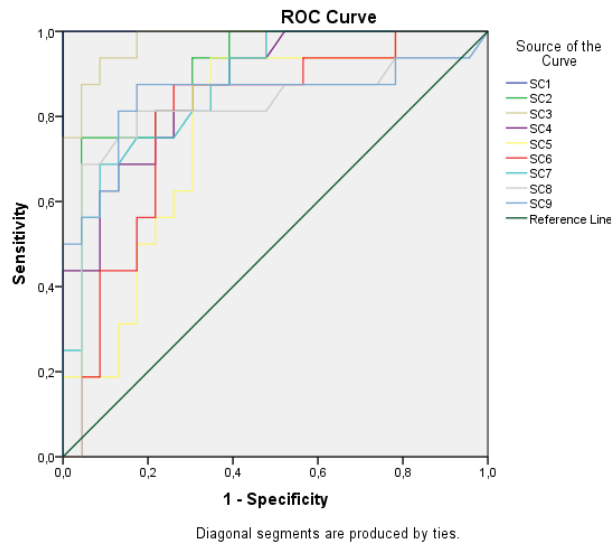
Grafički prikaz kretanja srednje vrednosti broja somatskih ćelija



Promena broja somatskih ćelija u poslednjoj nedelji u odnosu na prvu nedelju (logaritmovane vrednosti,  $5,6=400.000$ ;  $5,29=200.000$  ćelija; jedna krava isključena iz ogleda).



ROC krive pokazuju da krave koje imaju normalan broj somatskih ćelija na početku oglada u velikoj meri zadržavaju normalan broj tokom celokupnog oglada, što dokazuje protektivnu ulogu srednjelančanih masnih kiselina.



## Literatura

1. Bach, AC & Barbayan, VK 1982 Medium-chain triglycerides: an update. *American Journal of Clinical Nutrition* 36 950–962 CrossRef | Google Scholar | PubMed
2. Bellinati-Pires, R, Waitzberg, DL, Salgado, MM & Carneiro-Sampaio, MMS 1993 Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions – evaluation of phagocytosis, bacterial killing & oxidative activity. *Journal of Leukocyte Biology* 53 404–410 CrossRef | Google Scholar | PubMed
3. Bernabucci, U, Ronchi, B, Lacetera, N & Nardone, A 2005 Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88 2017–2026 CrossRef | Google Scholar | PubMed
4. Dohme, F, Machmüller, A, Wasserfallen, A & Kreuzer, W 2000 Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science* 80 473–482 CrossRef | Google Scholar
5. Grummer, RR & Socha, MT 1989 Milk fatty-acid composition and plasma energy metabolite concentrations in lactating cows fed medium-chain triglycerides. *Journal of Dairy Science* 72 1996–2001 CrossRef | Google Scholar | PubMed

6. Henry, GE, Momin, RA, Nair, MG & Dewitt, DL 2002 Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 2231–2234 CrossRef | Google Scholar
7. Laloučková, K., Malá, L., Slaničková, P. and Skřivanová, E., 2019. In vitro antimicrobial effect of palm oils rich in medium-chain fatty acids against mastitis-causing Gram-positive bacteria. *Czech Journal of Animal Science*, 64(8), pp.325-331.
8. Lemieux, H, Bulteau, AL, Friguet, B, Tardif, J-C & Blier, PU 2011 Dietary fatty acids and oxidative stress in the heart mitochondria. *Mitochondrion* 11 97–103 CrossRef | Google Scholar | PubMed
9. Mehrzad, J, Duchateau, L, Pyörälä, S & Burvenich, C 2002 Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science* 85 3268–3276 CrossRef | Google Scholar | PubMed
10. Mehrzad, J, Duchateau, L & Burvenich, C 2004 Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *Journal of Dairy Science* 87 4150–4162 CrossRef | Google Scholar | PubMed
11. Mehrzad, J, Duchateau, L & Burvenich, C 2005 High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Veterinary Research* 36 101–116 CrossRef | Google Scholar | PubMed
12. Piepers, S. and De Vliegher, S., 2013. Oral supplementation of medium-chain fatty acids during the dry period supports the neutrophil viability of peripartum dairy cows. *Journal of dairy research*, 80(3), pp.309-318.
13. Versleijen, M, Roelofs, H, Preijers, F, Roos, D & Wanten, G 2005 Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. *Clinical Nutrition* 24 822–829
14. Versleijen, MWJ, van Esterik, JCJ, Roelofs, HMJ, van Ernst-de Vries, SE, Willems, PHGM & Wanten, GJA 2009 Parenteral medium-chain triglyceride-induced neutrophil activation is not mediated by a Pertussis toxin sensitive receptor. *Clinical Nutrition* 28 59–64
15. Wanten, GJA, Janssen, FP & Naber, AHJ 2002 Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length. *European Journal of Clinical Investigation* 32 285–289.

## **PATOFIZIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA I INTEPRETACIJA LABORATORIJSKIH PARAMETARA U KRVI ŽIVOTINJA (Radionica)**

Marko R. Cincović

*Departman za veterinarsku medicinu, Laboratorija za Patološku fiziologiju, Poljoprivredni fakultet,  
Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8  
Kontakt: [mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com)*

### **Patofiziološka dijagnostika anemija i policitemija**

Anemija je poremećaj koji nastaje kao posledica smanjenog broja eritrocita i/ili smanjene koncentracije hemoglobina u cirkulaciji. U odnosu na sadržaj hemoglobina u eritrocitima razlikujemo hipohromne i hiperhromne anemija, u odnosu na veličinu eritrocita razlikujemo makrocitne i mikrocitne anemije. Za primenu terapije neophodno je odrediti mogućnost kapaciteta kostne srži za regeneraciju iste u odnosu na nastalu anemiju, pa se anemije dele na regenerativne i neregenerativne.

Pri postavljanju dijagnoze kod procene anemija, neophodno je izvršiti više analiza, koje su u smislu racionalne dijagnostike predstavljene od opštih ka specifičnim metodama prema redosledu koji sledi: 1. analiza standardne krvne slike, 2. analiza razmaza periferne krvi, 3. analiza koštane srži.

Analiza standardne krvne slike podrazumeva: 1. ispitivanje hematološkog statusa (određivanje hematokrita, broja eritrocita, koncentracije hemoglobina, eritrocitnih indeksa); 2. ispitivanje biohemijaskog statusa (serumsko gvožđe, feritin, kapacitet vezivanja gvožđa i slobodni transferin); 3. ispitivanje markera hemolize (nekonjugovani bilirubin, hemoglobin u urinu, haptoglobin, hemosiderin u urinu); 4. ispitivanje imunoloških markera (Coombsov test, eritrocitna antitela i sl.)

Hematokrit se određuje pomoću posebnih kapilarnih mikrocevčica i centrifuge za mikrohematokrit. Cevčice su promera 1mm i dužine 7 cm. Postupak izvođenja testa: Cevčica se položi nakon toga se meri odnos korpuskularnog i tečnog dela krvi (lenjirom ili posebnim čitačem). Nakon očitavanja a uz primenu tabele referentnih vrednosti, možemo konstatovati snižen hematokrit (koji se javlja u anemijama i uslovima hipohidratacije), povišenu vrednost hematokrita (kod dehidratacije ili policitemiju) ili normalnu vrednost hematokrita. Na osnovu vrednosti hematokrita anemije se dele na blage (Hct=30-37), umerene (Hct=20-29), teške (Hct=13-19) i vrlo tešku (Hct<13). Navedeni primer je vezan za pse.

U brojnim anemijama se javlja smanjena koncentracija hemoglobina. Za detaljniju dijagnostiku bitno je odrediti eritrocitne indekse: MCV (mean cell volume, srednja vrednost zapremine eritrocita), MCH (mean cell-corpuscular hemoglobine, srednja vrednost količine hemoglobina u ćeliji), MCHC (mean cell-corpuscular hemoglobine concentration, srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitima). Na osnovu vrednosti MCV anemije se dele na normocitne, mikrocitne i makrocitne. Na osnovu MCH anemije se dele na normohromne i hipohromne. Kod mikrocitne i hipohromne anemije dolazi do pada koncentracije hemoglobina, hematokrita, MCV i MCH. Kod megaloblastne anemije se uz smanjenu koncentraciju hemoglobina i hematokrita pokazuje se i povišena vrednost MCV i MCH. U kliničkoj praksi najčešće vrste anemije: makrocitna hipohromna anemija, normocitna normohromna anemija, mikrocitna anemija sa ili bez hipohromazije.

Za procenu funkcionalnog statusa eritrocita, pored ispitivanja hemoglobina, značajno je i ispitivanje osmotske otpornosti (fragilnosti) eritrocita. Za ovaj test se krv uzima sa suvim antikoagulansom. Suština teste je da se ista zapremina krvi stavlja u niz epruveta u kojima postoji opadajuće razblaženje NaCl (postiže se povećanjem zapremine vode i smanjenjem zapremine NaCl u nizu epruveta). Zbog osmoze tečnosti dolazi do hemolize eritrocita. U prvoj epruveti u kojoj je došlo do hemolize javlja se žućkasti sadržaj iznad sedimentiranih eritrocita, a u poslednjoj epruveti u kojoj je došlo do hemolize sadržaj je ružičasto obojen (kompletna hemoliza) i u njoj nema istaloženih eritrocita. Rezultati koji se ovim ispitivanjem mogu dobiti su snižena osmotska fragilnost eritrocita, povišena osmotska fragilnost i

normalan nalaz. Snižena osmotska fragilnost se javlja kod retikulocitoze, deficijencije gvožđa, bolesti jetre i prisustva leptocita. Povišena osmotska fragilnost se javlja kod nasledne sferocitoze i eliptocitoze, imunoposredovanih hemoliznih anemija, kod hronične azotemije i dr. Minimalne vrednosti rezistencije variraju od 0,74 g% NaCl (kod svinja) do 0,40 (kod živine); a maksimalne vrednosti rezistencije je oko 0,5g%, osim kod ptica gde je vrednost 0,28.

Pored navedenih ispitivanja za dijagnostiku anemija je značajno odrediti i koncentraciju gvožđa. Ona je snižena kod hipohromnih anemija (sideropenijska), ali i kod maligniteta i infekcija. Povišena vrednost gvožđa ukazuje na hemolizu ili nekrozu hepatocita (depo Fe). Pored gvožđa potrebno je odrediti transferin i stepen njegovog zasićenja, koji zavisi od koncentracije gvožđa i koncentracije transferina u krvi životinja.

Za ispitivanje markera hemolize značajno je odrediti: povišen nekonjugovani bilirubin, snižen haptoglobin, pozitivan hemoglobin u urinu, pozitivan hemosiderin u urinu, hemoglobinemiju, povišenu aktivnost LDH, povišenu aktivnost AP. O ovim markerima detaljnije govorimo u poglavlju Praktikumama koji se odnosi na dijagnostiku ikterusa.

Za određivanje imunološki posredovanih anemija značajan je Coombsov test. Direktni Coombsov test se određuje zbog utvrđivanja autoantitela na eritrocitima u autoimunim hemoliznim stanjima ili hemoliznim posttransfuzijskim reakcijama. Direktni antiglobulinski test (DAT) je hemaglutinaciona proba na antitela ili komplement vezan za eritrocite. Isprani fiziološke rastvori eritrocita se inkubiraju na 37°C i 4°C sa antiserumima koji sadrže antitela, poreklom od koza ili kunića, na IgG, IgM i komplement C3 pasa. Probu treba izvesti u mikrotitarskim pločama, koristeći serijska dupla razređenja antiseruma. Na taj način se prevazilazi efekat prozone, koji daje lažno negativan rezultat, jer višak antitela sprečava unakrsno povezivanje potrebno za aglutinaciju. Titar koji predstavlja rezultat je poslednje razređenje koje izaziva aglutinaciju eritrocita pacijenta. Na taj način se dobija orijentaciona ocena količine antitela koja su vezana za eritrocite.

Kada se radi o mikroskopskoj analizi razmaza eritrocita vrlo je značajno pravilno izbrojanje, broj retikulocita na 1000 eritrocita, koji govore o regenerativnosti anemije. Retikulociti se broje automatski pomoću hematološkog analajzera. U tabeli broj 1 opisane su karakteristike pojedinih vrsta eritrocita koje se javljaju u pojedinim anemijama.

Tabela 1: Oblici eritrocita koji se nalaze u različitim vrstama anemija

Oblik	Opis	Diferencijalna dijagnoza
MAKROCIT	Veličina preko 9 mikrona; Okrugao oblik, Smanjena bikonkavnost; Odsutno jedro i jedarce; Acidofilna citoplazma sa ili bez centralnog rasvetljenja; Povećana fragilnost (smanjena konkavnost i istanjenost).	Megaloblasna eritropoeze (Deficit b12 vitamina i folata). Diseritropoeza usled mijelodisplastičnog sindroma. Oštećenje lipidne membrane Er u bolestima jetre. U aplastičnim anemijama (nerazjašnjene etiologije).
MIKROCITI	Manji od 6 mikrona; Tanki; Okruglog do loptastog oblika; Bez jedra i jedarca; Acidofilna citoplazma Sa ili bez centralnog rasvetljenja-ako ga ima prošireno je i veliko (anulociti – deficit Fe); Bez inkluzija; Nešto smanjena oksigenacija.	Anemija usled deficita Fe i Hb, Anemija u hroničnim bolestima, Anemija kod neoplazija, Talasemija, Pojava patološkog hemoglobina, Trovanja, Nasledna sideroblasna anemija, Nasledni nedostatak feritina i sl.
ŠISTOCITI	Manji od 6 mikrona; Različiti oblici-fragmenti; Bez jedarca i jedra; Acidofilna citoplazma sa malim centralnim rasvetljenjem ili znatno češće bez; Smanjene oksigenacije; Manje elastični i osetljivi-fragmentacija opne lako nastaje (nepravilni oblici, u vidu šlema, trougla, polulopte).	Hemolizne anemije usled mikroangiopatija i traumatskih hemoliza Uremija Tokom maligne arterijske hipertenzije Nasledna piropoikilocitoza
STOMATOCITI	Veći od normalnih Er; Imaju samo jednu konkavnu stranu; Citoplazma je acidofilna sa	U vrlo malom procentu se nalaze fiziološki

	neobojenom uzdušnom zonom (kao usnestoma-Fish mouth cells); Nešto tanji, Okrugli ili ovalni; Diskretno smanjene oksigenacije; Poremećen katjonski transport kroz membranu Er.	Bolesti jetre Alkoholizam ljudi Nasledna stomatocitoza
ELIPTOCITI	Ovalni bikonkavni eritrociti; Duže se zadržavaju u slezini i sporo prolaze kroz kapilare; Manji od 6 mikrona; Lako hemoliziraju; Smanjena oksigenacija.	Nasledna eliptocitoza (ovalocitoza), Deficit Fe, Talasemija, Diseritropoeza, Megaloblastična anemija, Mijeloftizna anemija.
EHINOCITI	Normalni Er ili manji od 6 mikrona; Okruglog i izduženog oblika, sa nazubljenom opnom-oblik čička; Smanjena elastičnost; Lako hemoliziraju; Smanjena oksigenacija	In vitro hemoliza, Renalna insuficijencija, Bolesti jetre, Hemoliza usled sudara, Malnutricija (hipomagnezija, hipofosfatemija), Deficijencija piruvat-kinaze
AKANTOCITI	Ovalnog i okruglog oblika sa spikulama, različite debljine, liče na mamuze; Smanjene oksigenacije; Smanjena elastičnost, Sklonost ka hemolizi.	Asplenija i hiposplenija, Bolesti jetre, Abetalipoproteinemija, Neuroakantocitoza, Malnutricija, Diseritropoeza
DREPANOCITI	Er srpastog izgleda	Usled stvaranja štapićastih polimera hemoglobina S ili drugih patoloških hemoglobina. Usled različitih hereditarnih hemoglobinopatija.
DAKRIOCITI (Teardrop cell)	Er u obliku suze nastaju jer membrana eritrocita ne može da uspostavi predhodni oblik posle prolaska kroz uske krvne sudove ili zbog hiperplazije kostne srži. Mogu da se pojave i kao artefakti na ivicama krvnih razmaza.	Mijelofibroza, Metastaze tumora u koštanu srž, Ekstramedularna eritropoeza, Diseritropoeza, Megaloblastna anemija, Talasemija, Akutne leukemije, Multipli mijelom
PEČURKASTI ER (Pincer cell)	/	Nasledni poremećaji eritrocitne membrane Diseritropoeza
KERATOCITI (Horn cell)	/	Hemoliznih anemija ili izlaska Heinzovih i drugih inkluzija iz Er. Diseritropoeza
SFEROCITI	Manji od 6 mikrona; Loptastog oblika; Citoplazma bez centralnog rasvetljenja; Lako nastaje fragmentacija opne zbog smanjene elastičnosti i savitljivosti; Teško prolaze kroz kapilare; Zaostaju u slezini;	Povećana destrukcija Er, Nasledna sferocitoza, Autoimune hemolitičke anemije, Hemolizna reakcija na transfuziju, Oksidativno oštećenje Er, Cl.Perfringens toksin, Sepsa, Intoksikacija vodom.
KODOCITI (Target cell)	Pljosnat izgled sa smanjenjem debljine i uvećanjem prečnika; Citoplazma acidofilna sa obojenom centralnom i perifernom zonom; Bez inkluzija, jedra i jedarca.	Asplenija, Hiposplenija, Bolesti jetre – makrokodocit, Izraziti deficit Fe, Hemoglobinopatija C,D,E,H i S
MEHURASTA TELA U ER (Piknocit, Blister cell)	Nastaju usled koncentracije Hb u jednom delu Er, pa je deo Er prazan. Ova svetla polja mogu nastati i kao posledica odstranjenja Howel-Jollyevih telašaca.	DIK, Oksidativna oštećenja, Hemoglobin C bolest, Talasemija, Diseritropoeza, Nestabilnost Hb <b>RAZLIKOVATI OD HIPOHROMNIH ČELIJA!</b>
HOWELL-JOLLY-eva TELAŠCA	Slični Er; Okrugli do ovalni; Acidofilna citoplazma; Telašca su ostaci jedra ili odvojeni hromatin od mitoznog vretena; Telašce dimenzija 0,5-1 mikron; Najčešće prisutno jedno, mada može	Asplenija, Megaloblastna anemija, Hemolizna anemija, Neonatalni period.

	biti prisutno i nekoliko u jednom Er.	
HEINZOVA TELAŠCA	Vidi se jedino u bojenju sa kristali-violet (ne po Gimzi)	Enzimopatije (g-6DP deficijencija, Deficijencija piruvat-kinaze), Hemoglobinopatije, Talasemija
RETIKULOCITI	Prekursori eritrocita sa ostacima ribosoma i mitohondrija, zbog čega se nazivaju i polihromatofili.	Povećan broj retikulocita ukazuje na regenerativne anemije.

Za kompletnu dijagnostiku anemija značajno je pregledati kostnu srž i ispitati njenu celularnost na razmazu, te koristiti objektiv koji uveličava 40x. Celularnost se broji na osnovu broja ćelija sa jedrom u vidnom polju pri uveličanju sa objektivom 40x. Mijelogram ili kvalitativni i kvantitativni odnos u ćelijama koštane srži vrši se na osnovu brojanja i beleženja 200-300 ćelija s jedrom. Na osnovu broja ćelija u vidnom polju dijagnostikujemo stanja od aplazije do hiperplazije. Pored navedenog, značajno je ispitati odnos ćelija granulopeze i eritropoeze (koje su najzastupljenije u razmazu koštane srži) kako bi se dijagnostikovala hipo ili hiperplazija neke od loza.

Policitemija nastaje kao apsolutan ili relativan poremećaj, prateći dehidraciju, infekcije odnosno leukemijsku reakciju. Postoji nekoliko kriterijuma za dijagnostiku policitemije i ukoliko postoji veći broj nalaza koji su pobrojani možemo dijagnostikovati policitemiju: povećana masa eritrocita, normalna saturacija arterijske krvi kiseonikom u prisustvu eritrocitoze, splenomegalija, trombocitoza i/ili leukocitoza, hipercelularna kostna srž sa megakariocitnom hiperplazijom i odsustvom depoa Fe, nizak nivo eritropoetina u prisustvu povećane mase Er i spontane eritroidne kolonije bez dodavanja Epo u kulturama ćelija koštane srži.

### Patofiziološka dijagnostika poremećaja bele loze i leukemija

Povećan ukupan broj leukocita (leukocitoza) nastaje usled: inflamacije, nekroze tkiva, delovanja kortikosteroida i epinefrina, akutne limfoblastne leukemije, hronične limfocitne leukemije, akutne ili hronične mijeloidne leukemije, limfoma, deficijencije adhezivnih molekula leukocita. Smanjenje ukupnog broja leukocita (leukopenija) se javlja prilikom: jake infekcije, endotoksičnih stanja, aplastične anemije, aleukemičnih akutnih leukemija, infektivnih bolesti (FELV, FIV, štenećak, riketijalne infekcije), mijelodisplastični sindrom i dr.

Pored ukupnog broja leukocita značajno je odrediti i diferencijalnu krvnu sliku sa brojem bazofila, neutrofila, eozinofila, monocita i limfocita. Oni je mogu odrediti pomoću hematološkog brojača.

Povećan broj bazofila (bazofilija) ukazuje na hipersenzitivne reakcije, tumor mast ćelija, parazitizam, bazofilnu leukemiju i mijeloproliferativne bolesti. Bazopenija se vrlo teško dijagnostikuje, jer vrednost od nula bazofila kod većine životinjskih vrsta i ljudi ulazi u referentne vrednosti.

Eozinofilija se javlja u hipersenzitivnim reakcijama, parazitozama, limfomima, hipoadrenokorticismu, eozinofilnoj leukemiji i dr. Eozinopenija je teška za dijagnostiku, jer nula ulazi u referentnu vrednost, ali hronična eozinopenija ukazuje na insuficijenciju koštane srži.

Limfocitoza ukazuje na hroničnu antigensku stimulaciju, nelimfoidne neoplazme, imunski posredovane bolesti, limfocitne i limfoblastne leukemije. Lmfopenija nastaje kao posledica delovanja glukokortikoida, virusnih infekcija, imunosupresije, kod enteropatija sa gubitkom proteina, imunodeficientnih stanja i sl.

Monocitoza prati septikemična stanja, hemolize, odgovor na glukokortikoide, nehematopoezne neoplazme i oštećenje kostne srži, dok se monocitopenija teško dijagnostikuje.

Neutrofilija se javlja kod inflamacija, kao odgovor na glukokortikoide i epinefrin, zatim kod hronične mijeloidne leukemije i deficijencije adhezivnih molekula leukocita. Neutropenija se dešava kod endotoksemija, aplastične anemije, aleukemičnih leukemija, virusnih infekcija, imunoposredovanih bolesti i dr.

Pored određivanja broja leukocita i diferencijalne krvne slike značajno je odrediti i njihovu starost. Ona se određuje na osnovu prisustva blasta i stepena segmentiranosti njihovog jedra. Ako se u perifernoj krvi

javljaju mlađi oblici razvoja granulocitne loze, sa velikim brojom štapastih granulocita i metamijelocita, onda se takva pojava zove skretanje u levo. Skretanje u levo uz leukocitozu govori u prilog aktivnoj produkciji ćelija bele loze, ali je skretanje u levo uz leukopeniju prognostički vrlo loš znak kod mnogih bolesti.

Leukemije su maligne bolesti krvi kod kojih postoji progresivno razmnožavanje ćelija jedne od leukocitnih loza, koje je često praćeno povećanjem leukocita u perifernoj krvi, kao i povećanjem leukocitne mase u organizmu. Kod leukemijske proliferacije se zapaža izraziti poremećaj u diferentovanju i sazrevanju belih krvnih ćelija. Ovaj proces je izraženiji što je leukemija akutnija.

Leukemična stanja se odlikuju anemijom, sklonosti ka krvarenju i infekcijama zbog promene u odnosu populacija ćelija u koštanoj srži. Klinički se često leukemije otkriju posle kliničke slike dugotrajne apatije životinje, kada se ultrazvučnim pregledom otkrije tumorska masa u parenhimatoznim organima.

Konačna dijagnoza tipa leukemije postavlja se na osnovu patomorfološkog pregleda tumorske mase (ako postoji), citohemijskih metoda (bojene reakcije: mijeloperoksidaza, sudan crno B, nespecifične esteraze), imunofenotipskih ispitivanja ćelija leukocitne loze (određivanje CD subpopulacija i drugih leukocitnih antigena) i citogenetskih ispitivanja (ispitivanje hromozoma). Danas se razvijaju metode za upotrebu monoklonskih antitela za antigene različitih receptora na leukemičnim ćelijama što proširuje dijagnostičke mogućnosti. Ove metode po svom obimu i sadržaju prevazilaze potrebe za edukaciju studenata na integrisanim studijama i sadržaj Praktikumuma.

### **Patofiziološka dijagnostika poremećaja hemostaze**

Poremećaji hemostaznog sistema se manifestuju u nastanku sklonosti ka krvarenju ili u nastanku tromboze. Ovi problemi u kliničkoj patologiji nastaju kao posledica naslednog nedostatka nekog od faktora koagulacije, kao posledica trovanja (rodentici) ili kao posledica nastanka sepse i delovanja endotoksina, a manifestuju se kao sklonost ka diseminovanoj intravaskularnoj koagulaciji (DIK). Poremećaji u primarnoj hemostazi, koji su vezani za trombocite, najčešće dovode do petehija i ekhimoza, i nakon traume dolazi do neposrednog početka krvarenja. Problemi u proteinskom sistemu koagulacije praćeni su odloženim vremenom početka krvarenja uz nastanak krvarenja u zglobovima i dubljim tkivima. Brojanjem trombocita možemo dobiti sledeće rezultate: nepromenjen broj trombocita, trombocitozu ili trombofiliju. Krvarenja nastaju kao posledica značajnog smanjenja broja trombocita, ali i kod trombocitoze mogu nastati spontana krvarenja, ako proteinski elementi koagulacije ne funkcionišu optimalno.

Kod svih trombocitnih koagulopatija broj trombocita je poremećen, a kod pacijenta možemo odrediti test vremena krvarenja po Ajviju. Način izvođenja testa: Stavi se manžetna ili šira Esmarhovu povesku na nadlakticu i izvrši se blagi pritisak, a zatim se sa volarne strane ekstremiteta izvrši čišćenje alkoholom i ubode sterilna lanceta pod kožu, pazeći da se ne povrede krupniji krvni sudovi (vene) i uključi se štoperica. Pažljivo se, zatim, svakih 15 sekundi filter-papirom upija krv koja spontano teče iz uboda. Ova procedura se ponavlja dok krvarenje ne prestane. Tada se štoperica isključi i očitava proteklo vreme. Normalno vreme krvarenja je od 2-7 minuta, a produženo vreme ukazuje na smanjen broj ili poremećenu funkciju trombocita, poremećaj fon Wilebrandovog faktora, poremećaj u kontraktilnosti krvnih sudova i drugo. Pravljenjem umerenog pritiska na koži ekstremiteta i brojanjem petehija posle skidanja manžetne možemo proceniti kapilarnu otpornost od koje zavisi koagulabilnost krvi.

Testovi kojima se može ispitati funkcionalni status hemostaznog sistema su: određivanje parcijalnog tromboplastinskog vremena (PTT), protrombinskog vremena (PT) i trombinskog vremena (TT). PTT je grupni test za procenu nivoa i aktivnosti činilaca unutrašnjeg sistema aktivacije protrombina i zajedničkog koagualcionog puta. PT procenjuje funkcionalni status spoljašnjeg sistema aktivacije protrombina i zajedničkog koagualcionog puta. TT predstavlja vreme potrebno za združavanje plazme nakon dodavanja određene količine trombina. Ovim testom se isključuje uticaj svih koagulacionih faktora tj. puteva, osim delovanja fibrinogena na funkciju koagulacije. Normalne vrednosti PTT su od 35-75 (preko 100 kod mačaka) sekundi. Protrombinsko vreme je od 11-23 sekundi zavisno od vrste aktivnosti tkivnog ekstrakta koji se koristi u testu. Normalna vrednost TT iznosi između 15 i 25 sekundi. Patološke vrednosti se



dobijaju produženjem ili skraćanjem navedenih perioda. Za klinički rad je značajno da na osnovu navedenih parametara možemo dijagnostikovati vaskularni, trombocitni ili koagulacioni poremećaj hemostaze, pomoću shodno ključa datog u sledećoj tabeli.

Pored navedenih, postoje i brojni specifični testovi koji se mogu dalje koristiti u detaljnijoj proceni funkcionalnog statusa hemostaze. Tako se npr. može ispitati adhezivnost (stepen adhezije trombocita iznad poveske, dobija se poređenjem broja trombocita pre stavljanja poveske i u različitim periodima nakon toga, uzimanjem krvi iz krvnog suda ispod poveske) i agregabilnost trombocita (pomoću agregometra). Postoje posebne metode za kvantifikaciju faktora koagulacije.

Diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK) može da predstavlja veliki problem u svakodnevnom radu, posebno u opstetriciji, hirurgiji, toksičnim i malignim stanjima. Kada postoji izuzetna trombocitopenija i prolongirano parcijalno trombotično, trombinsko i protrombinsko vreme treba posumljati na DIK. Tada je značajno odrediti fibrinogen, razgradne proizvode fibrina (fibrinolizni sistem) i parakoagulacione testove.

Fibrinogen se kvantitativno može odrediti klinički orijentacionim precipitacionim testovima ili se u slučaju specijalnih ispitivanja vrše detaljnija funkcionalna ispitivanja. Koncentracija fibrinogena u DIK-u je snižena.

Razgradni produkti fibrina jesu D i E molekuli i D dimer, a to su periferni i centralni domeni fibrinogena tj. fibrina. Određuju se lateks aglutinacijom (lateks čestica obložena antitelima protiv D i E fragmenata) koja daje makroskopski vidljive komplekse. Povišene vrednosti D i E molekula ukazuju na povišenu fibrinoliznu aktivnost koja se dešava u DIK-u.

Prilikom delovanja trombina na fibrinogen izvesna količina molekula fibrin-monomera se ne polimerizuje nego stvara rastvorljive komplekse sa molekulima fibrinogena. Prisustvo pomenutih monomera i fibrinogena se dokazuje parakoagulacionim testovima, koji se zasnivaju na činjenici da neke materije razlažu ove komplekse i izazivaju želatinizaciju ispitivane plazme. Prisustvo ovih rastvorljivih kompleksa monomera govori o trombinskoj aktivnosti i stimulanosti koagulacionog sistema. U DIK-u se javljaju pozitivni parakoagulacioni testovi.

Pomenuti testovi mogu fiziološki biti izmenjeni kod infekcija i pri hirurškim zahvatima.

U pretromboznom stanju značajan je dijagnostički postupak, koji se odlikuje povišenom aktivnošću hemostaznog sistema, jer se može završiti tromboznim stanjem i egzitusom životinje. Zbog toga je važno odrediti D-dimer, D i E fragment (markeri fibrinoliznog sistema); kao i fibrinopeptide protrombinske fragmente i fibrinske monomere (markeri aktivacije koagulacije) i metaboličke markere aktivisanih trombocita (trombospondin i tromboglobulin).

Referentne vrednosti produkata degradacije fibrina su ispod 10 $\mu$ g/ml seruma. Koncentracija fibrinogena varira u odnosu na vrstu od 50 do 400 mg/dl.

### **Patofiziološka dijagnostika poremećaja funkcije jetre i egzokrinog pankreasa**

Jetra ima brojne uloge u organizmu, koje se mogu podeliti na: uloga u metabolizmu bilirubina, detoksikaciji, kao i brojne biosintetske uloge i uloge u metabolizmu. Ova podela je korisna sa aspekta poremećaja funkcije jetre, obzirom da većina bolesti jetre daje neke od navedenih znakova: poremećaj opšteg zdravlja, ikterus, anemija, disproteinemije i dislipidemije. U procesu dekompenzacije nastaje i ascites, endokrinološki poremećaji i hepatična koma.

Ikterus/žutica nastaje retencijom konjugovanog ili nekonjugovanog bilirubina. Vrstu žutice određuje odnos nekonjugovanog bilirubina i konjugovanog bilirubina u krvi. Prehepatička ili hemolitička žutica nastaje u hemolitičkim stanjima kada razgradnja eritrocita i oslobađanje bilirubina u ćelijama RES-a prevazilazi kapacitete jetre za njegovo preuzimanje. Hiperbilirubinemija je posledica povećanja koncentracije nekonjugovanog bilirubina u krvi. Hepatička ili hepatocelularna žutica je najčešći oblik žutice, koji nastaje pod dejstvom raznih etioloških agenasa, koji dovode do neposrednog oštećenja jetre. Kao posledica otežanog izlučivanja već konjugovanog bilirubina javlja se holestaza koja se karakteriše stazom žuči u intrahepatičkim žučnim kanalima, usled čega dolazi do regurgitacije žuči u krvotok. Ekstrahepatička ili opstruktivna žutica nastaje u slučaju parcijalne ili potpune opstrukcije glavnih

žučnih puteva. Kod pasa i mačaka se ne javlja često, mada je opisano više slučajeva, najčešće kao posledica spoljašnje kompresije žučnih puteva tumorima, opstrukcije holelitima i kod nekih upala i striktura žučnih puteva i duodenuma.

Kao posledica poremećene sinteze proteina, skraćenog života eritrocita, zbog hipersplenizma ili teških gastrointestinalnih krvarenja i portne hipertenzije nastaje anemija uz koju se najčešće javlja i promena u broju leukocita i trombocita.

Ascites primarno nastaje kao poremećaj ravnoteže između intravaskularnog (v. porte) i intersticijalnog prostora (tečnost u peritonealnoj duplji). Osnovni činioci poremećaja hidrostatskog i onkotskog pritiska su portna hipertenzija i hipoalbuminemija. Ascites najčešće nastaje u slučajevima istovremenog razvoja hipoalbuminemije i portne hipertenzije. Hepatička portna hipertenzija je izazvana intrahepatičkim poremećajima koji ometaju cirkulaciju u sinusoidima - najčešće kao posledica difuzne fibroze jetre, hroničnog hepatitisa, lipidoze, tromboze vena unutar jetre, zastoja žuči, neoplazmi, itd. Hipoalbuminemija u prvom redu nastaje kao posledica insuficijencije jetre. Prehepatička portna hipertenzija je izazvana poremećajima portnog krvotoka presinusoida i može da nastane usled kompresije ili tromboze portne vene i njenih ogranaka i usled arterijsko-venskih malformacija. Posthepatička portna hipertenzija nastaje kao posledica poremećaja u predelu vene hepaticke, kaudalne šuplje vene ili srca. Tako, na primer, do sekundarnih smetnji u portnoj cirkulaciji može da dođe kod insuficijencije srca, kon-striktornog perikarditisa, tamponade srca, opstrukcije vene kave kaudalis tumorima ili trombima, tromboze vene hepaticke, itd.

Hepatična encefalopatija nastaje zbog nemogućnosti jetre da preuzme i neutrališe toksične produkte iz portne krvi. Do ove pojave dolazi kod teških oštećenja jetrinog parenhima kada hepatociti nisu u stanju da neutrališu preuzete toksine, ili kod porto-kavalnih šantova kada portna krv sa toksinima apsorbivanim u crevima zaobilazi jetru. Osnovni mehanizam nastanka ove pojave je vezan za sledeći mehanizam: toksini iz intestinalnog trakta portnim krvotokom kroz jetru ili zaobilazeći jetru dospevaju u sistemski krvotok. Najvažniji toksini koji se javljaju su amonijak i kratkolančane masne kiseline.

Najčešće bolesti pankreasa su: pankreatitis (akutni i hronični), insuficijencija egzokrinog pankreasa i neoplazme pankreasa. Nije dovoljno ispitano gde primarno nastaju patološke promene na pankreasu tokom zapaljenskog procesa (na endotelu krvnih sudova pankreasa, na acinusnim ćelijama ili ćelijama izvodnih kanala), ali bez obzira na tok ovog procesa krajnji ishod je autoliza pankreasa. U kliničkoj slici pankreatitisa dominira bol u epigastrijumu, anoreksija, depresija, povraćanje, hipertermija, eventualno krvav proliv, teška dehidracija, ikterus i šok, dok u prolongiranim i hroničnim upalama nastaju i nervni poremećaji, anemije, steatoreja, mršavost, promene na koži i drugo.

U ispitivanju funkcionalnog statusa **jetre** vrši se određivanje i analiza **hepatograma**. Hepatogram se sastoji od nekoliko jetrinih profila, koji zajedno čine neki od hepatičnih sindroma: sindrom zapaljenske reakcije, sindrom bilijarne retencije, sindrom insuficijencije hepatocita i sindrom nekroze hepatocita.

Sindrom zapaljenske reakcije podrazumeva opšte principe za dijagnostiku zapaljenskog procesa: određivanje leukograma, sedimentacije krvi, gama globulina i dr. Navedeni nalazi su nespecifični.

Sindrom bilijarne retencije obuhvata određivanje: koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina u krvi, koncentracije urobilinogena u krvi, koncentracije žučnih boja u mokraći i fecesu, koncentracije holesterola u krvi, serumaska aktivnost AP i GGT i test ekskrecije bromsulfaleina.

Parametri koji ukazuju na smanjenje pojedinih funkcija jetre (sindrom insuficijencije jetre) su: koncentracija albumina u krvi, koncentracija amonijaka u krvi, koncentracija proteinskih faktora koagulacije krvi, protrombinsko vreme, ekskrecija bromsulfaleina, koncentracija holesterola i žučnih kiselina u krvi.

Parametri koji ukazuju na nekrozu jetrinog parenhima (sindrom nekroze hepatocita) odgledaju se u aktivnosti sledećih enzima: Alanin aminotransferaza (ALT), Asparat aminotransferaza (AST), Izocitrat dehidrogenaza (ICD), Sorbitol dehidrogenaza (SDH), Ornitin-karbamil transferaza (OCT), Laktat dehidrogenaza (LDH), Alkalna fosfataza (AP), Holinesteraza i dr.

Bilirubin se određuje diazo-reagensom, a na osnovu odnosa konjugovanog i nekonjugovanog bilirubina razlikujemo tri osnovna tipa ikterusa. U hemolitičkom ikterusu je značajan nalaz povećanje koncentracije nekonjugovanog bilirubina. Kod hepatocelularnog ikterusa postoji značajno povećanje koncentracije

konjugovanog (preko 50%) i nekonjugovanog bilirubina. Kod posthepatičnog opstruktivnog ikterusa značajno je povećana koncentracija konjugovanog bilirubina (do 90%). Određivanje urobilinogena je značajno za dodatnu dijagnostiku ikterusa, tako da je urobilinogen uvek prisutan kada su žučni putevi prohodni, dok kod posthepatičnog opstruktivnog ikterusa njegovo prisustvo izostaje. Sterkobilinogen i sterkobilin izmeta daju uvek pozitivnu reakciju kod zdravih jedinki.

Amonijak se određuje posle izolacije putem jonoizmenjivačkih smola. Određivanje se vrši enzimski preko NADH ili u reakciji sa natrijum hipohloritom i fenolom. Koncentracija amonijaka je povišena u bolestima jetre, posebno u dekompenzovanim stanjima. Za ispitivanje sposobnosti jetre da detoksikuje organizma od amonijaka izvodi se test opterećenja amonijakom na sledeći način: per oralno se aplikuje amonijum hlorid - 100 mg/kg telesne mase, a 30 minuta kasnije se ispituje koncentracija amonijaka u krvi. Normalna koncentracija amonijaka kod pasa i mačaka iznosi 35-70 mmol/L, dok je kod konja ona 0-40 mmol/L. Nakon peroralne primene amonijum hlorida, koncentracija amonijaka u krvi se kod zdravih pasa ne podiže iznad 117 mmol/L.

Biosintetska funkcija jetre se određuje merenjem koncentracije albumina i imunoglobulina, uz određivanje faktora koagulacije, ali i drugih proteina (npr. proteina akutne faze). Porast Ig ukazuje na hronične procese u jetri (poliklonska gamopatija), što se na elektroforetskoj traci očitava kao beta-gama fuzija (jer se frakcije beta i gama spajaju).

Određivanje holesterola može imati dijagnostički značaj jer povećanje holesterola ukazuje na opstruktivni ikterus, dok se kod teških oštećenja jetre javlja smanjena koncentracija holesterola.

Žučne kiseline u krvi se mere u četiri faze: za vreme gladovanja, 2 h posle obroka, posle peroralnog unošenja soli žučnih kiselina i kao brzina izlučivanja intravenski unetih soli žučnih kiselina obeleženih radioaktivnim izotopima.

Test ekskrecije bromsulfaleina (BSP) je specifičan test ekskrecione sposobnosti jetre. Način izvođenja testa: Intravenski se ubrizga 0,1 ml/kg telesne mase bromsulfaleina i nakon 30 minuta ispituje se koncentracija boje koja se zadržala u krvi. U normalnim okolnostima za 30 minuta izlučuje se više od 95% bromsulfaleina.

Enzimi se određuju enzimatskim kolorimetrijskim i drugim metodama. Kretanje koncentracije ALT nema prognostički značaj jer nije u korelaciji sa stepenom oštećenja jetre. Poluvreme ALTa iznosi 1-2 dana, a moguće je da njegova koncentracija raste i prilikom aktivne regeneracije jetre. Uzrok ove pojave je činjenica da je ALT enzim citosola. AST je mitohondijalni enzim, pa njegovo prisustvo govori o nekrozi hepatocita. Ipak, AST nije dovoljno specifičan za hepatična oboljenja, jer može biti povišen i prilikom muskularnih bolesti, hemolize i dr. Serumska alkalna fosfataza (AP) predstavlja grupu više izoenzima koji potiču iz različitih tkiva i organa. Kod mačaka se u jetri nalazi znatno manje AP, pa njen porast najčešće ukazuje na bubrežne bolesti. Porast AP uz jetrene sindrome najčešće govori oolestazi. Posebno interesantan enzim je arginaza, s obzirom da se posle uspešne terapije brzo vraća u normalne granice, pa ima prognostički značaj. Kod kopitara je značajna sorbitol-dehidrogenaza.

Kod pankreasnog profila korisno je odrediti amilazu, lipazu i TLI (eng. Trypsin-Like Immunoreactivity). Rezultati koncentracije serumske amilaze i lipaze nisu u korelaciji sa težinom pankreatitisa. Amilaza i lipaza nisu potpuno specifični za pankreas. Bubrežna funkcija utiče na amilazu i lipazu, dok steroidi mogu da povise koncentraciju ovog enzima. Amilaza i lipaza nisu značajne za dijagnostikovanje pankreatitisa kod mačaka.

Interesantno je ispitivanje funkcije pankreasa prilikom dislokacije sirišta mlečnih krava, kada su vidljivi sledeći rezultati: hiperglikemija (kod jake dislokacije i preko 10 mmol/l, održavanje hiperglikemije posle hirurškog tretmana je loš prognostički znak, smanjena tolerancija na glukozu, hiperlipidemija, ketonemija, povećana aktivnost jetrinih enzima, hemokoncentracija, leukocitoza sa neutrofilijom, hipokalemija, hipohloremija, hiponatremija, hipokalcemija i hipofosfatemija (često kod krava u postpartalnom periodu pojava ovog nalaza predisponira krave ka nastanku dislokacije zbog atonije).

TLI (Trypsin-Like Immunoreactivity) određuje se specifičnim imunoesejom seruma u cilju dijagnostike insuficijencije egzokrinog pankreasa. Ovim testom se primarno meri pepsinogen, inaktivnog prekursora tripsina u serumu. TLI testom se dokazuje oslobađanje tripsinogena iz pankreasa. Kod pankreatitisa TLI test će dati povišene vrednosti (ali i kod jake insuficijencije bubrega), dok će vrednosti biti snižene kod

insuficijencije pankreasa. Normalne vrednosti TLI su: 5,7-45,2 µg/L kod pasa, 12-82 µg/L kod mačaka, ali rezultati variraju u odnosu na različite laboratorije.

### **Patofiziološka dijagnostika poremećaja urinarnog sistema**

Urinarni sistem ima brojne funkcije u organizmu jer učestvuju u regulisanju metabolizma vode i jona i ima endokrinu ulogu. Svi poremećaji funkcije urinarnog sistema mogu biti uzrokovani prerenalnim (hipovolemija i/ili hipotenzija mogu da smanje protok krvi kroz bubrege i izazovu poremećaj funkcije bubrega), renalnim (glomerulske: nefritične (primarno zapaljenjske) i nefrotične (primarno degenerativne), neglomerulske: vaskularne, tubularne i intersticijalne) i postrenalnim uzrocima (koji izazivaju opstrukciju bubrežnih puteva).

Svetska zdravstvena organizacija je dala klasifikaciju bubrežnih bolesti, koja je napravljena po etiopatogenezi i može se primenuti u veterinarskoj medicini. Tako se bubrežne bolesti dele na: akutni nefritisni sindrom, nefrotski sindrom, asimptomatska urinarna abnormalnost (grupa 2 i 3 – kao posledica hroničnog glomerularnog nefritisa), akutna bubrežna insuficijencija, hronična bubrežna insuficijencija, infekcija urinarnog trakta, opstruktivna bolest urinarnog trakta, funkcijski defekti bubrežnih tubula, hipertenzivna nefropatija i nefrolitijaza i nefrokalcinoza.

Osnovni simptomi poremećaja urinarnih organa su: 1) prisustvo oligurije, poliurije ili anurije, 2) nespecifični simptomi (depresija, letargija, inapetencija, groznica, povraćanje...), 3) karakteristični nalaz urina (proteinurija, hematurija, glukozurija, kristalurija...) i 4) karakterističan nalaz u krvi (azotemija, uremija, dislipidemija, anemija i drugo).

Količina mokraće (diureza) zavisi od očuvane funkcije bubrega, hrane i vode koja se unosi tokom dana. Na količinu mokraće utiču resorpcija različitih edema, dijabetes, poremećaji vezani ADH i Na, kao i vazopresin.

Boja i prozirnost mokraće se posmatra na beloj pozadini. Mokraćna kod konja je žuta ili žuto-zelena boja; kod psa svetlo-žuta do ćilibarno žuta; kod goveda slamno-žuta (svetlo do tamno). Veoma tamna boja mokraće se javlja kod paralitičke mioglobinurije, dok se izrazito svetla boja javlja kod šećerne bolesti. Mokraćna je tamnija kod dehidracije i febrilnih stanja. Različite nijanse žute i crvene moguće su kod babezioze. Mrko-crvena boja javlja se kod davanja fenotiazina, ali i kod životinja sa porfirinurijom. Kod ekvida mokraćna je neposredno po izlučivanju mutna, a nakon dužeg stajanja se obrazuje talog. Kod ostalih životinjskih vrsta, mokraćna je bistra, a posle dužeg stajanja se stvara neznatan talog. Zamućenost mokraće zavisi od sadržaja soli, prisustva epitelnih ćelija, masti ili mikroorganizama.

Miris mokraće je dosta specifičan za pojedine životinjske vrste i njegov intenzitet zavisi od koncentrovanosti mokraće. Na miris mokraće utiču i različita patološka stanja. Tako npr. acetonemija kod krava, koja dovodi do acetonurije daje specifičan miris mokraće na aceton, koji može biti toliko jak da cela štala miriše aceton.

Specifična težina mokraće se određuje urometrom koji je baždaren između 1,000 i 1,060. Ona je u obrnutoj srazmeri sa količinom izlučene mokraće. U šećernoj bolesti, se uz povećanu diurezu povećava i specifična težina mokraće (prelivna glukozurija).

pH vrednost mokraće je kisela kod mesojeda i bazna kod biljojeda. Bazna mokraćna kod mesojeda ukazuje na nekrotične procese u bubregu ili na zapaljenje mokraćne bešike. Kisela mokraćna kod biljojeda se javlja tokom gladovanja, enteritisa, pneumonije i dugotrajnih proliva. Hrana bogata azotom zakišeljiva mokraćnu biljojeda. Određivanje pH se vrši pH-metrom ili test-trakama.

Hemijsko ispitivanje pomoću test traka se vrši po sledećoj proceduri – Test traka se uroni u svež urin i drži najviše 1 sekund. Nakon 30-60 sekundi se upoređuje boja na trakici sa bojom na standardnoj skali. Nakon dva minuta stajanja rezultati su nevalidni. Test trakama se određuje više parametara, kao što su: Glukoza- normalno nalaz je negativan, a pozitivan je kod prelivne glukozurije i diabetesa; Bilirubin- normalno nalaz je negativan, a pozitivan nalaz se dobija u sklopu ikterusa; Ketoni- prisutni prilikom metabolički neregulisane šećerne bolesti; Krv- test trakice tolerišu određeni broj eritrocita, tj. određenu koncentraciju hemoglobina (reakcija je vezana za Hb), a reakcija je pozitivna kod hematurije; Belančevine- normalan nalaz je negativan, a test traka toleriše određenu koncentraciju proteina;

Urobilinogen- normalan nalaz je lako pozitivan, a ne može se koristiti za dijagnostiku opstruktivne žutice; Nitriti- normalan nalaz ovog pregleda je negativan, dok pozitivan nalaz ukazuje na bakterijsku uroinfekciju (kod biljojeda se može dobiti lažno pozitivan nalaz zbog sadržaja nitro jedinjenja u biljkama); Leukociti- nalaz ukazuje da u mokraći ima manje od  $10 \times 10^6/L$ , a leukociturija ukazuje na zapaljenje.

Za dijagnostiku ketoze krava posebno je značajno određivanje ketonskih tela u mokraći krava. Za dijagnostiku se koristi acetat-test po Lestradetu (Rothera test), koji se zasniva na promeni boje natrijum-nitro prusida promeni u prahu od ružičaste (+) do tamnoljubičaste (++++) ukoliko postoje ketonska tela. Ipak, za preciznu dijagnozu je potrebno odrediti koncentraciju ketona u mmol/l (spektrofotometrijski, kolorimetrijski), a rezultati se tumače na sledeći način: 0,5-2,5 mmol/l normalno, 2,5-13 subklinička ketoza i 13-600 klinička ketoza.

Proteini u mokraći se određuju kvalitativnom ili kvantitativnom metodom. Od kvalitativnih metoda koristi se reakcija sa sulfasalicilnom kiselinom. Način izvođenja testa: Kap sulfasalicilne kiseline se kapne u epruvetu sa mokraćom i posmatra zamućenje. Zamućenje se posmatra prema crnoj podlozi i možemo dobiti sledeće nalaze: negativan (bistar), belančevine u tragu (+, jedva primetno zamućenje), jasno pozitivna (++, vidljivo zamućenje), jako pozitivna (+++, stvaranje sitnih pahuljica), i sirast talog (++++ (taloženje na dnu epruvete).

U mokraći se često kod obolelih od multiplog mijeloma nalaze Benc-Džonsovi proteini, laki lanci imunoglobulina. Značajna karakteristika ovih proteina je da se talože na temperaturi između 45 i 55°C, a rastvaraju se na višim temperaturama, što koristi za dokazivanje njihovog prusustva.

Kvantitativno određivanje proteina može se vršiti putem taloženja u Esbahovom albuminometru ili biuretskom reakcijom. Pri tome je važno izvršiti razdvajanje frakcija proteina ili dokazivanje prisustva pojedinih frakcija imunoenzimskim i drugim preciznim metodama. Pri pojava proteina u mokraći potrebno je izvršiti dodatna ispitivanja i posebno obratiti pažnju na donje urinarne puteve, iz kojih se eksudacijom tokom upale izdvajaju proteini. Konačna dijagnoza se postavlja ispitivanjem tipova proteina, te se tokom oštećenja glomerula javlja puno albumina i visokomolekulskih proteina u mokraći (transferin, IG, komplement), a tokom oštećenja tubula albumini sa niskomolekulskim proteinima, a moguća je i pojava prelivne proteinurije.

Pregled sedimenta mokraće se izvodi sledećom procedurom – Mokraća se centrifugirati 5-10 min na 1500-2000 obrtaja/min. Nakon toga se mokraća odlije a 1-2 kapi se stave na predmetnicu, pokriju ljuspicom i posmatraju pod mikroskopom na uveličanju 100-400x. Pojavi sedimenta pogoduje nizak pH, proteinurija, usporeno oticanje filtrata, prisustvo mukoidin-sumporne kiseline. Mikroskopskim nalazom sedimenta možemo videti: leukocite, eritrocite, cilindre i kristale, itd.

Leukociti – Najčešće vidimo 4-8 u vidnom polju. Povećan broj ukazuje na infekciju ili hemijsku leziju urinarnog trakta.

Eritrociti – Normalno se vidi 1-3 eritrocita u vidnom polju. Povećan broj eritrocita se javlja kod hematurije, koja se može videti golim okom (prisutna promena boje - makrohaturija) ili mikroskopom (mikrohaturija). Eritrociti mogu biti sveži (očuvan oblik i oštre ivice, žučkasto-crveni) ili disformični vidljivi kao blede senke i nepravilnog izgleda. Hematurija može biti prerrenalna, renalna i postrenalna. Eritrociti u mokraći mogu da potiču i iz genitalnih organa ženke, posebno kod kuja tokom ciklusa, što može dati lažno pozitivan rezultat. Kod hemoglobinurije je koncentracija hemoglobina povišena, a broj eritrocita nije, dok kod mioglobinurije (koja je česta kod kraš i blast sindroma, praznične bolesti konja i drugo) javlja bistru mokraću uz porast koncentracije kreatinfosfokinaze.

Cilindri, ćelije, neorganski sediment – To su istaložene proteine u obliku distalnih bubrežnih kanalića. Razlikujemo više vrsta cilindara: eritroidni – ružičaste boje, često kod glomerulonefritisa; leukocitni – tipično kod pijelonefritisa, ali i kod nekih vrsta glomerulonefritisa, mogu biti pojedinačni leukociti ili masa; epitelni – pri težem oštećenju tubula, akutna zapaljenja bubrega; granulirani – kod izrazite tubulske lezije bubrega; hijalini – homogeni svetli cilindri, koji prate proteinuriju, ali ne ukazuju uvek na određeni tip oštećenja bubrega; široki – stvaraju se u sabirnom kanaliću bubrega, prilikom bubrežne insuficijencije; masni – cilindri sa masnim kapljicama na površini (džinovske epiteloidne ćelije bogate mastima); voštani cilindri – nastaju zbog dugog boravka u lumenu tubula i izrazito smanjenog protoka urina u tubulima, u sklopu glomerularnih oboljenja. Cilindroidi nisu pravi cilindri, već se radi o grupisanju pojedinih

elemenata, kristala, belančevina bakterijskih ćelija i dr. Određen broj epitelnih ćelija se normalno nalazi u mokraći i potiče iz bilo kog dela urinarnog trakta. Za detekciju je najvažnije uočiti epitelne ćelije, koje potiču iz tubulskog epitela, jer one ukazuju na zapaljenske procese i bubrežnu insuficijenciju. Te ćelije su veće od leukocita, sa okruglim jedrom i često jasno vidljivim nukleolusom. Pojava repastih epitelnih ćelija mogu biti znak dublje nekroze epitela urinarnog trakta, a izbledele i isprane ćelije, najčešće ukazuju na nefritis. Sveži eritrociti ukazuju na zapaljenje kontakne bešike (cistitis), a smežurane ćelije se nalaze u hiperosmolarnoj mokraći.

Razne materije u amorfnom ili kristalnom obliku. U baznoj mokraći se često vide kristali fosfatnog porekla, dok se kristali mokraćne kiseline i uratni kristali vide u kiseljoj mokraći. Neki lekovi (sulfonamidi) se izlučuju putem kristala i mogu biti različitog su oblika.

Pri detekciji eritrocita, leukocita i drugih celularnih elemenata u sedimentu mokraće, zbog tačnosti je potrebno izbrojati ih u komorici za krv, u poznatoj zapremini. Proteinurija sa velikim brojem izbrojanih eritrocita ukazuje da je hematurija bubrežnog porekla. Pojava eritrociturije, proteinurije i eritrocitnih cilindara u mokraći dokazuje da je hematurija najverovatnije posledica glomerulske bolesti bubrega. Leukociturija sa pojavom leukocitnih cilindara ukazuje na bakterijsku infekciju bubrega, odnosno mokraćnih puteva.

Određivanje ureje, kreatinina i mokraćne kiseline su klasične biohemijske metode i opisane su u poglavlju 3. Povećana koncentracija ureje dovodi do uremije, koja može biti bubrežna i vanbubrežna. Bubrežna je vezana za smanjenu funkcionalnu sposobnost bubrega, a vanbubrežna nastaje pojavom hipovolemije, dehidratacije, obilnih krvarenja u gastrointestinalnom traktu, bolestima jetre i dr. Znatno smanjeno lučenje kreatinina ukazuje na razvoj bubrežne insuficijencije. Lučenje kreatinina zavisi od mišićne mase tela, a kreatinin se ne reapsorbuje ni u jednom nefrotskom segmentu. Povišenje koncentracije mokraćne kiseline u serumu nastaje kod akutne ili hronične bubrežne insuficijencije, u sklopu opšte retencije azotnih materija u krvi i kod ekstrarenalne azotemije. Porast koncentracije mokraćne kiseline u serumu je hiperurikemija i može biti primarna (giht) i sekundarna. Primarna hiperurikemija je vezana za enzimsku disregulaciju metabolizma mokraćne kiseline, a sekundarna za različite proliferativne bolesti, leukemije i policitemiju veru, citotatsku terapiju malignih bolesti i u svim bolestima gde se javlja povećan katabolizam sopstvenih proteina.

Ispitivanje dilucione sposobnosti bubrega – Način izvođenja metode: Izvrši se opterećenje vodom i uzima se mokraću na svakih 15-30 minuta i meri njena specifična težina. U toku dva časa zdravi bubrezi izluče polovinu unete tečnosti. Ukoliko specifična težina nije na donjoj fiziološkoj granici ili ispod nje, a ne izluči se kompletna količina vode u periodu od nekoliko časova, smatra se da postoji problem sa dilucionom sposobnošću bubrega. Proba dilucije ukazuje na funkciju glomerula, tj. njihovu moć filtracije i na nju utiču mnogi vanbubrežni faktori (aldosteron, ADH i srčana pumpa). Ovu metodu ne treba primenjivati kod pacijenata sa edemima, a kod pacijenata sa izraženom dehidratacijom ne dobijamo pouzdane rezultate. Ovaj test je manje specifičan od testa koncentracione sposobnosti bubrega.

Ispitivanje koncentracione sposobnosti bubrega – Način izvođenja metode: Ovaj test vrši se posle uskraćivanja vode (u periodu od 12 časova) ili nakon aplikacije antidiureznog hormona. Nakon 1 i 2 sata uzima se uzorak mokraće i meri specifična težina koja treba da bude blizu gornje fiziološke granice ili preko nje. Pad koncentracione sposobnosti se javlja kod hroničnog pijelonefritisa, hronične opstruktivne uropatije i uznapredovale bubrežne insuficijencije.

Osmometrija mokraće – Koncentraciona sposobnost bubrega se najpreciznije određuje upoređivanjem osmolarnosti urina i seruma. Osnova osmometrije je u 4 koligativne osobine rastvora i to su: smanjivanje tačke mržnjenja i isparavanja i povišenje tačke ključanja i osmotskog pritiska. Za ovu metodu koristi se konduktometar.

Određivanje bubrežnih klirensa – Bubrežni klirens je deo volumena plazme koji se može indirektno izmeriti i koji se zahvaljujući radu bubrega u jedinici vremena oslobodi neke materije tako što je bubreg iz krvi prenese u stvorenu mokraću. Klirens je odnos količine klirensne supstance klirensa izlučene mokraćom u jedinici vremena i koncentracije te supstance u plazmi. Klirensi materija prirodno prisutnih u plazmi nazivaju se klirensi endogenih supstanci (urea, kreatinin, vodonikovi joni), dok su klirensi egzogenih materija klirens para-aminohipurne kiseline (PAH), insulina, radioaktivni Cr-EDTA. Klirensi

inulina, Cr-EDTA i kreatinina ukazuju na jačinu glomerulske filtracije (JGF) – jer se ove materije izlučuju samo putem glomerulske filtracije. PAH i J-hipuran se izlučuju putem JGF i tubulske sekrecije, govore o efektivnom bubrežnom protoku plazme (EBPP). Frakcijska filtracija (FF) predstavlja odnos između JGF i EBPP i daje uvid u stanje glomerulsko-tubulske ravnoteže u bubregu.

Za određivanje klirensa endogenog kreatinina uzima se 24-časovna diureza. Klirens kreatinina se preračunava u odnosu na površinu tela pacijenta. Kod određivanja klirensa ureje treba isprazniti mokraćnu bešiku, dati pacijentu određenu količinu vode i u narednih sat vremena izmeriti klirens ureje. Klirens ureje je znatno osetljiviji na protok krvi kroz bubrege i znatno je promenljiviji.

Poređenjem parametara, posebno osmolarnosti mokraće i seruma, koncentracije Na mokraće i seruma, odnosa BUN/kreatinin u plazmi, JGF i FF vrši se lokalizacija urinarnog poremećaja (prerenalna, renalna i postrenalna), uzroci akutne bubrežne insuficijencije (insuficijencija bez nekroze, insuficijencija sa nekrozom kore i insuficijencija sa nekrozom srži bubrega) i faze hronične bubrežne insuficijencije (hipofunkcija, kompenzacija, dekompenzacija i uremija).

### **Patofiziološka dijagnostika poremećaja metabolizma tečnosti, acido-baznog statusa i jona**

Postoje četiri osnovne osobine telesnih tečnosti a to su: izovolemija (održavanje stalne zapremine i odnosa telesnih tečnosti), izotonija (održavanja stalnog osmotskog pritiska – koji se javlja između dva rastvora različite koncentracije jona.), izojonija (održavanje stalnog kvalitativnog i kvantitativnog sastava i međusobnog odnosa jona) i izohidrija (održavanje stalne koncentracije vodonikovih jona, tj. acido-bazne ravnoteže telesnih tečnosti).

Poremećaj prometa telesnih tečnosti se javlja u vidu: promene volumena telesnih tečnosti (dehidratacija i hiperhidratacija), promene osmolarnosti (hiperosmolarnost/hipertonija ili hipoosmolarnost/hipotonija), promene koncentracije pojedinih jona (u smislu hiper ili hipo izmena) i promene acidobazne ravnoteže (acidoza i alkalozna).

Primarni poremećaj telesnih tečnosti, jona i acidobazne ravnoteže je redak slučaj, te se dijagnostički postupci vezani za ovaj sistem, najčešće izvode kao dopunski, uz obaveznu analizu svih mogućih faktora koji mogu dovesti do poremećaja ovog sistema. Neophodno je poznavati osnovne uzroke, koji dovode do poremećaja metabolizma tečnosti, acidobazne ravnoteže i jona.

Uzroci dehidratacije su: smanjen unos vode, povećano odavanje vode (dijareja, povraćanje, znojenje, eksudacija, poliurična faza bubrežne insuficijencije, u dijabetes melitusu i insupidus).

Uzroci hiperhidratacije su: povećan unos vode i/ili soli, infuzije natrijuma ili bikarbonata, hiperadrenokortizam, oligurična faza bubrežne insuficijencije, primarni aldosteronizam i dekompenzovana srčana slabost.

Uzroci respiratorne acidoze su: opstrukcija vazdušnih puteva, depresija respiratornog centra (nervne bolesti, lekovi, toksemije), kardiopulmonarni arrest, neuromuskularne bolesti (botulizam, miastenija gravis, polimiozitis, hipokalemijska miopatija mačaka), restriktivne bolesti (diafragmatska hernija, pneumotoraks, piotoraks, hemotoraks i fibroza pluća), plućne bolesti (respiratorni distress sindrom, pneumonija, plućni edem, COPD i fibroza pluća).

Uzroci metaboličke acidoze su: diabetična ketoacidoza, uremična acidoza, laktična acidoza, hipoadrenokortizam, dijareja i renalna tubularna acidoza.

Uzroci respiratorne alkaloze su: levo-desni šant, kongenitivne srčane bolesti, plućne bolesti, neke vrste anemija, nervne bolesti, hepatične bolesti, bol, groznica i hipertireoidizam, mehanička ventilacija.

Uzroci metaboličke alkaloze su: povraćanje, diuretska terapija, oralna primena organskih anjona, hiperadrenokortizam i primarni hiperaldosteronizam.

Uzroci hiperkalemije su: pseudohiperkalemija (trombocitoza, povećan broj leukocita, hemoliza), smanjenja urinarna ekskrecija kalijuma (uretralna opstrukcija, ruptura uretera, anurijsko ili oligurijsko oštećenje bubrega, hipoadrenokortizam) i povećan unos kalijuma.

Uzroci hipokalemije su: povraćanje, dijareja, hronične bubrežne bolesti, opstruktivna diureza, diureza u ketoacidozi i aplikacija furosemda.

Uzroci hipernatremije su: gubitak vode bez gubitka soli ili gubitak hipotonične tečnosti (povraćanje, dijareja, opstrukcija tankih creva, pankreatitis, peritonitis, osmotska dijareja u diabetesu) i povećan unos soli.

Uzroci hiponatremije: poremećaji sa normalnom osmolarnošću (hiperlipidemija, izražena hiperproteinemija), poremećaji sa povišenom osmolarnošću (hiperglikemija) i poremećaji sa smanjenom osmolarnošću (hiperhidratacija, bolesti jetre sa ascitesom, kongestivne srčane bolesti, nefrotski sindrom, uznapredovale renalne bolesti, proliv, dijareja, gubici preko kože, peritonemua, psihogena polidipsija, sindrom nedovoljnog lučenja ADH i miksedomna koma u hipotireoidizmu).

Uzroci hiperkalcemije: višak PTH, vitamina D3 i veliki unos Ca putem hrane.

Uzroci hipokalcemije: malapsorpcija promene u lučenju i delovanju PTH i promene u metabolizmu vitamina D3.

Uzroci hiperhloremije: jak selektivni gubitak natrijuma, primena hlorida, renalna retencija hlorida, hiperhloremijska metabolička acidoza usled dijareje i gubitka bikarbonata. Pojava perzistentne hiperhloremije indikuje pregled na Na, K i gasne analize krvi.

Uzroci hipohloremije: su slični kao u hiponatremiji, a najčešće hronično povraćanje i agresivna terapija tiazidina. Perzistentna hipohloremija zahteva dalja ispitivanja.

Dijagnostički postupak poremećaja metabolizma tečnosti je ispitivanje promena u ekstracelularnoj tečnosti (ispitivanje volumena i osmolarnosti), promena u intracelularnoj tečnosti, izojonije i izohidrije.

Promene volumena ekstracelularne tečnosti ispituju se analizom koncentracije ukupnih proteina i brojanjem eritrocita. Dehidratacija dovodi do porasta koncentracije proteina i povećanja broja eritrocita po mililitru krvi. Ove pojave se mogu otkriti i manje pouzdanom metodom ispitivanja hematokrita. U istraživačke svrhe koristi se određivanje volumena tečnosti dilucionom radioizotopskom tehnikom.

Promene osmolarnosti se određuju u odnosu na promenu koncentracije natrijuma u serumu, a merenje osmolarnosti može se vršiti i direktno osmometrom. Hipernatremija znači i hiperosmolarnost, osim u slučaju hiperlipidemije ili hiperproteinemije (kada lipidi i proteini zauzimaju određenu zapreminu u tečnosti i ne sadrže Na) ili u slučaju dijabetesa kada tečnost izlazi ekstracelularno, čime razblažuje natrijum, te je osmolarnost povećana zbog glukoze.

Kod toplotnog stresa mlečnih krava koncentracija proteina, broj eritrocita i eritrocitni indeksi mogu dati nejasnu sliku, jer dominira smanjen unos hrane i povišen unos tečnosti, pa treba dati adekvatno tumačenje dehidratacije.

Ispitivanje izojonije podrazumeva biohemijsko određivanje koncentracije Na, K, Ca, Mg, H i OH. Za određivanje jona se koriste klasične titrimetrijske metode ili klasičnim komercijalnim kitovi u plamenom fotometru, odnosno selektivne elektrode koje su prilagođene za određene vrste jona. Sa kliničkog aspekta treba posmatrati odnos  $(K, Na \text{ i } OH) / (Ca, Mg \text{ i } H)$ . Kada koncentracija jona iz brojioca raste ili koncentracija jona iz imenioca opada nastaju grčevi skeletne muskulature i poremećaji u radu srca, dok obrnuti proces smanjuje tonus muskulature i srčani rad.

Za procenu stanja izojonije treba posmatrati pH seruma, koncentraciju bikarbonata, parcijalni pritisak kiseonika i ugljenik-4-oksida kao i odnos Na-bikarbonata i ugljene kiseline koji bi trebao da je 20:1 (Henderson-Haselbahova jednačina).

### **Racionalna patofiziološka dijagnostika poremećaja metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina**

Poremećaji metabolizma ugljenih hidrata se ispituje kroz funkcionalne testove za endokrini pankreas. Mnoge životinje imaju latentnu sklonost ka nastanku dijabetesa, pa se kod ovih životinja vrši glukoza tolerans test uz aplikaciju kortizola. Latentni dijabetes može brzo preći u manifestnu formu usled stresa, čiji je kortizol glavni medijator.

Testovi za ispitivanje glikogenskog depoa u jetri i njene sposobnosti da održi normoglikemiju su:

1) Test tolerancije epinefrina se zasniva na osobini epinefrina da povećava glikogenolizu aktivacijom adenilat-ciklaze. Ako jetra nije oštećena, nakon parenteralne aplikacije epinefrina već za 40-60 minuta glikemija se povećava za 50% u odnosu na fiziološku vrednost, a za 1h vraća se u okvire



normoglikemije. Izostajanje epinefrinskog efekta javlja se kod insuficijencije jetre ili kod praznih glikogenskih depoa tokom gladovanja.

2) Test opterećenja galaktozom se zasniva na sposobnosti galaktoza, koja je monosaharid, da se pretvori u glukozu. Ovaj proces je enzimatski regulisan i odvija se u više etapa. Test se izvodi tako što se i.v. aplikuje rastvor galaktoze, a zatim se u vremenskim intervalima prati njeno nestajanje u krvi. Test se primenjuje kod preživara, konja i pasa korišćenjem 10 mL/kg telesne mase rastvora galaktoze, koncentracije 2,8 mM. Kod zdravih životinja, galaktoza se u vremenu od 1h metaboliše u glukozu, ali ako je oštećena jetra, galaktoza se duže ili kraće zadržava u krvotoku i nakon toga se javlja galaktozurija.

Glavni **lipidi** krvi su: holesterol (slobodni i esterifikovani), trigliceridi, ukupni fosfolipidi i neesterifikovane masne kiseline. Lipoproteini su složeni transportni oblici koji se sastoje od lipida i glikoproteina-zvani apoproteini. Prema kretanju u elektroforezi dele se na: hilomikrone, pre beta-lipoproteine, beta-lipoproteine i alfa-lipoproteine. Prema sastavu tj. gustini posle ultracentrifugiranja dele se na: VLDL (Very low density lipoproteins) – lipoproteini veoma niske gustine, LDL (Low Density Lipoproteins) – lipoproteini niske gustine, HDL (High Density Lipoproteins) – lipoproteini visoke gustine i VHDL (Very high Density Lipoproteins) – lipoproteini vrlo visoke gustine.

Povećana koncentracija lipida u krvi naziva se hiperlipidemija i ona može biti: postprandijalna, primarna (idiopatska hiperlipoproteinemija, idiopatska hiperhilomikronemija kod mačaka, deficijencija lipoproteinskih lipaza i idiopatska hiperholesterolemija), sekundarna (hipotireoidizam, diabetes mellitus, hiperadrenokortizam, pankreatitis,olestaza, hepatična insuficijencija i nefrotski sindrom).

Holesterol se određuje standardnom fotometrijskom metodom. Reagens za holesterol je holesterol-oksidaza koja reaguje sa hromogenom i daje promenu boje u intenzitetu koja je proporcionalna sa koncentracijom holesterola. Indikacije za određivanje koncentracije holesterola su: primarna hiperlipoproteinemija, diabetes mellitus, nefrotski sindrom, bolesti tireoidee, bolesti jetre, malapsorptivni sindrom i dr. Povišene vrednosti holesterola se javljaju kod sledećih poremećaja: familijarna hiperlipoproteinemija, nefrotski sindrom, nekontrolisani dijabetes, opstruktivna žutica, miksedem, ksantomatoza, akutne hemoragije i hipotireoidizam. Hipoholesterolemija se javlja kod: anemije, bolesti jetre, infekcije, kaheksije, glomerulonefritisa, stresa, dekompenzovanog srca, koronarne tromboze, akutnog infarkta miokarda, karcinoma i dr.

Trigliceridi se takođe određuju klasičnom fotometrijskom metodom. Indikacije za određivanje triglicerida su: hiperlipoproteinemije, trovanja teškim metalima, bolesti štitnjače, malapsorptivni sindrom itd. Hipertrigliceridemija se javlja kod sledećih poremećaja: hiperlipoproteinemija, diabetes mellitus-a, nefrotskog sindroma, uremije bez nefroze, pankreatitisa, nekih glikogenoza, trovanja teškim metalima i dr. Snižene vrednosti triglicerida se javljaju kod sledećih poremećaja: hronična opstruktivna bolest pluća, infarkt mozga, hipertireoidizam, malapsorpcijski sindrom, nasledni nedostatak holesterol-acil transferaze i dr.

Frižiderski test se koristi za ispitivanje tipa hipertrigliceridemije. Test se izvodi na sledeći način: serum ispitanika se ostavi na temperaturi od +4°C, pa se nakon stajanja 18-24h vrši procena njegovog izgleda. Normalan serum i serum u izolovanoj hiperholesterolemiji je bistar. Kod nakupljanja VLDL (hipertrigliceridemija) serum pokazuje određeni stepen замуćenja. Lagane čestice hilomikrona formiraće flotacijom hilomikronski čep.

U humanoju populaciji razlikujemo 5 tipova hiperlipoproteinemije u zavisnosti od tipa lipoproteina koji dominira, frižiderskog test i kakva je koncentracija holesterola i triglicerida. Slična klasifikacija postoji i kod pasa.

Kod mlečnih krava je vrlo značajna pojava zamašćenja jetre, koja nastaje kao posledica negativnog energetskog bilansa u peripartalnom periodu, tj. na početku lakracije. Negativni energetski bilans se ogleda u stepenu lipomobilizacije čiji je pokazatelj koncentracija slobodnih masnih kiselina. Kada je njihova koncentracija 0,3-0,5 mmol/l smatra se da je proces lipomobilizacije u fiziološkim granicama, dok vrednosti preko 0,7 mmol/l ukazuju na intenzivnu nekontrolisanu lipomobilizaciju. Intenzivna lipomobilizacija narušava transport triglicerida iz jetre (nema dovoljno VLDL jer je narušena sinteza proteina) pa se oni nagomilavaju u hepatocitima.

Poremećaj metabolizma proteina je objašnjen kroz predhodna poglavlja. Osnovne indikacije za ispitivanje metabolizma proteina su: ispitivanje hidriranosti organizma, ispitivanje uzroka edema, ispitivanje uzroka infekcija, dokazivanje upale, ispitivanje autoimunih procesa, ispitivanje bolesti jetre, ispitivanje proteinurije, dokazivanje paraproteinemije, ispitivanje proteinskih nosača seruma, ispitivanje malognih neoplazmi, ispitivanje opekotina i dr.

Posebni proteini koji su značajni za dijagnostički postupak su enzimi. Oni i njihova katalitička aktivnost određuju se različitim kolorimetrijskim metodama, imunoenzimskim metodama i radio-imunoenzimskim metodama, različitim histohemijskim metodama bojenja a aktivnost im se izračunava posebnim formulama. Uzorak za ispitivanje enzima mogu biti: krv, serum, limfa, peritonealna tečnost, pleuralni izliv, bioptat, saliva, suze itd. Enzimi koji imaju istu ili sličnu enzimsku aktivnost, a različite fizičke ili fizičko-hemijske osobine nazivaju se izoenzimi i nastaju kao posledica stvaranja u različitim delovima ćelije. Prema mestu gde obavljaju svoju ulogu dele se na enzime lučenja (sekretorne) i intracelularne enzime. Organski enzimski profil se određuje na osnovu: nivoa aktivnosti enzima glavnih metaboličkih puteva, koji se porede jedan sa drugim, pomoću organospecifičnih enzima i raspodele izoenzima. Enzimi izlaze u ekstracelularni prostor gde postoji koncentracioni gradijent između intracelularnih i ekstracelularnih prostora. Kod životinjskih ćelija postoji brza izmena enzima kroz ćelijske membrane, tako da kod najmanjeg oštećenja ćelija intracelularni enzimi izlaze ekstracelularno. Serumski enzimski profil se dobija ispitivanjem enzima u serumu ako postoji neko oboljenje. Mali broj enzima su organospecifični, pa se dijagnostika pomoću serumskih enzima vrši upoređivanjem dobijenih rezultata iz seruma i poznatim enzimskim profilom organa. Za poklapanje ovih profila potrebno je da postoji teško oštećenje organa, kao i da je tom prilikom zahvaćen samo jedan organ, kako se ne bi došlo do mešanja sa profilima drugih organa.

#### **Interaktivna analiza 4 slučaja po jedan sa svakog časa kombinovanjem realnih kliničkih slučajeva i metode etiopatogenih čvorova**

Rešavanje slučajeva kombinovano online i na radionici.

## **APARAT ZA INHALACIONU ANESTEZIJU – BEZBEDNA UPOTREBA (Radionica)**

Bojan Toholj, Spasojević Jovan

*Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad, R. Srbija  
Autor za kontakt: [bojantoholj@gmail.com](mailto:bojantoholj@gmail.com)*

### **Sažetak**

Aparat za inhalacionu anesteziju ima zadatak da dostavi smešu gasova (kiseonika i inhalacionog anestetika) u određenoj količini i koncentraciji do pacijenta. Iako se često navodi da je inhalaciona anestezija najbezbedniji tip anestezije, ipak je potrebno dobro poznavanje strukture aparata za inhalacionu anesteziju jer je to jedan od osnovnih preduslova bezbednog vođenja celog anesteziološkog postupka. Osnovni delovi aparata za inhalacionu anesteziju se mogu podeliti prema veličini pritiska gasa koji u njima vlada, pa tako postoje delovi sa visokim pritiskom (kiseonik boca i regulator), delovi sa srednje visokim pritiskom (protkomer), dok u delove sa niskim pritiskom spadaju isparivač (vapor) i disajni krug.

Ključne reči: inhalaciona anestezija, anestetici

### **Uvod**

Iako se često navodi da je inhalaciona anestezija najbezbedniji tip anestezije, ipak je potrebno dobro poznavanje strukture aparata za inhalacionu anesteziju jer je to jedan od osnovnih preduslova bezbednog vođenja čitavog anesteziološkog postupka (1,2,3,6).

Osnovni zadaci aparata za inhalacionu anesteziju su:

- Snadbevanje kiseonikom
- Dostavljanje tačno određene količine i koncentracije anestetika
- Odstranjivanje ugljendioksida
- Održavanje i kontrola ventilacije pacijenta

Aparat za inhalacionu anesteziju priprema preciznu mešavinu gasova (kisonik i anestetik) i preko sistema za disanje tu smešu gasova dostavlja do pacijenta, uz istovremenu eliminaciju ugljendioksida.

### **Konstrukcija i funkcija delova aparata za inhalacionu anesteziju**

Pritisak gasova u sistemu zavisi od dela aparata za inhalacionu anesteziju, a poznavanje ovih delova je neophodno za razumevanje rada i siguran rad sa anesteziološkim aparatom.

Sistem je sastavljen od delova sa visokim, srednje visokim i niskim pritiskom (Slika 1.) (4,5,6).

Deo pod visokim pritiskom se sastoji od boca sa visokim pritiskom u kome se nalazi kiseonik, creva za visoki pritisak i ventila (reduktora). Pritisak u ovom delu sistema iznosi 150-200 bara.

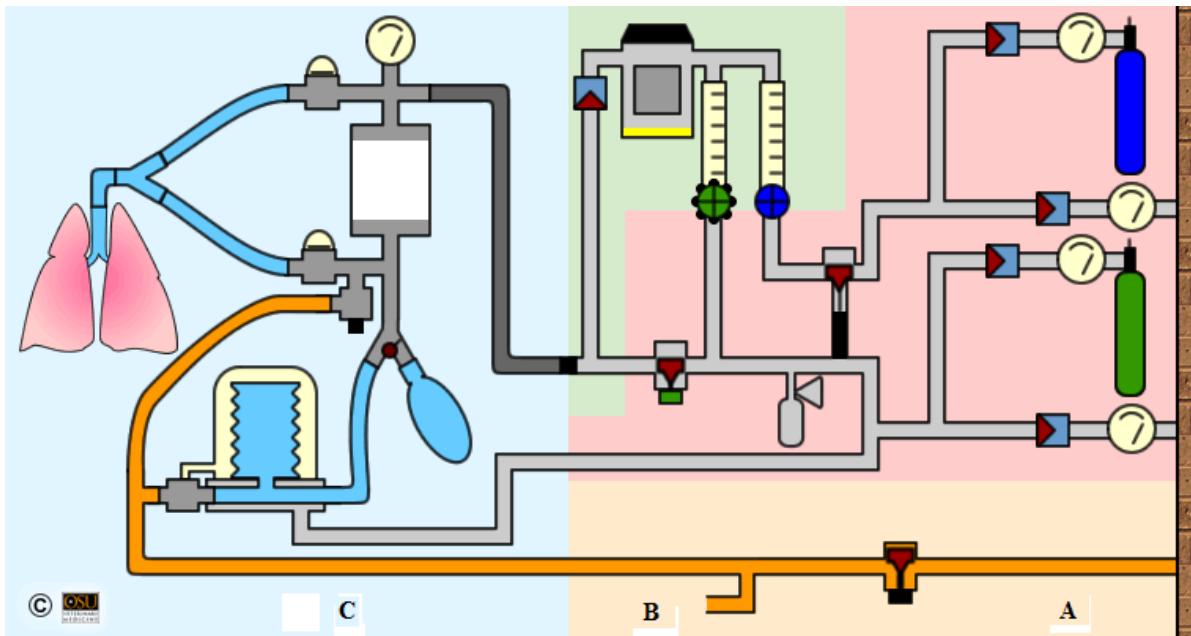
Deo pod srednje visokim pritiskom sprovodi gasove (kiseonik) od redukujućeg ventila do protokmera (dela koji reguliše protok kiseonika u jedinici vremena). Pritisak u ovom delu iznosi 3-5 bara.

Deo pod niskim pritiskom je onaj deo aparata za inhalacionu anesteziju koji počinje od protokmera, nastavlja se isparivačem i dalje sa sistemom za dostavu gasova do pacijenta.

Boce za gasove su osigurane i namenski pravljene da izdrže visok pritisak kao i da se izbegne pogrešno instaliranje i povezivanje. Kiseonik se koristi da bi omogućio disanje pacijentu kao i da bi poslužio kao nosač za anestetički gas. Kiseonik se čuva u bocama koje mogu da se nalaze uz sam aparat za inhalacionu anesteziju (tzv. E cilindri koji sadrže do 700 litara kiseonika) ili da budu smešteni van prostorija operacione sale i klinike (tzv. H rezervoar koji sadrži i do 7000 litara). Svakako da je skladištenje kiseonika van objekta mnogo bezbednije ali podrazumeva i izgradnju specijalnih vodova (metalnih cevi) sa priključnicama. U velikim klinikama ovaj sistem se posebno dizajnira i služi ne samo za

inhalacionu anesteziju, nego i za pokretanje pneumatskih uređaja i sl. Pritisak kiseonika unutar tankova je 200 bara.

Ventil za redukciju pritiska (reduktor) – Visoki pritisak koji vlada u cilindrima mora da se umanjiti kako ne bi oštetio aparat za inhalacionu anesteziju. Ovaj reduktor snižava pritisak na 40-50 psi (*pounds per square inches*). Ovaj pritisak treba da je konstantan bez obzira na visinu pritiska u cilindrima.



**Slika 1.** Shematski prikaz aparata za inhalacionu anesteziju: **A.** Deo pod visokim pritiskom **B.** Deo pod srednje visokim pritiskom **C.** Deo pod niskim pritiskom

Merač protoka kiseonika (protokmetar) – Gas prolazi kroz sistem iz cilindra, kroz cev pod visokim pritiskom i dospeva do reduktora, koji snižava pritisak na 40-50 psi, a zatim se kiseonik transportuje putem creva do protokmeta koji reguliše protok kiseonika. Ovaj merač se sastoji od staklene cevi unutar koje se nalazi kuglica. Puštanjem kiseonika kroz cev, podiže se i kuglica, a visina do koje kuglica dosegne je kalibrisana i označava protok kiseonika u minuti (litara/minut). Protokmer dodatno smanjuje pritisak gasa, tako da kiseonik koji izlazi iz protokmeta je sada manjeg pritiska i usmerava se prema isparivaču. Postoje različite vrste protokmeta za svaki gas. Odavde, sistemom niskog pritiska, gas se usmerava prema pacijentu.

Direktni (bajpas) ventil – Aparat za inhalacionu anesteziju poseduje i bajpas ventil, koji omogućava da kiseonik zaobiđe protokmer i isparivač, te bude direktno dostavljen do pacijenta. Na ovaj način se brzo dostavlja kiseonik do pacijenta i puni se sistem za disanje. Međutim, ovaj ventil sme da se koristi samo u zatvorenom sistemu (pojašnjenje u nastavku teksta), zbog toga što je kiseonik koji se na taj način ubacuje u sistem za disanje pod visokim pritiskom pa može izazvati barotraumu kod pacijenta.

Isparivač (evaporator) – Najčešće upotrebljavani inhalacioni anesteici su u tečnom stanju na sobnoj temperaturi i normalnom atmosferskom pritisku. Ove tečnosti se prevode u gasovito stanje u isparivaču koji uz to vrši i precizno doziranje količine gasa u kiseoniku koji se doprema do pacijenta.

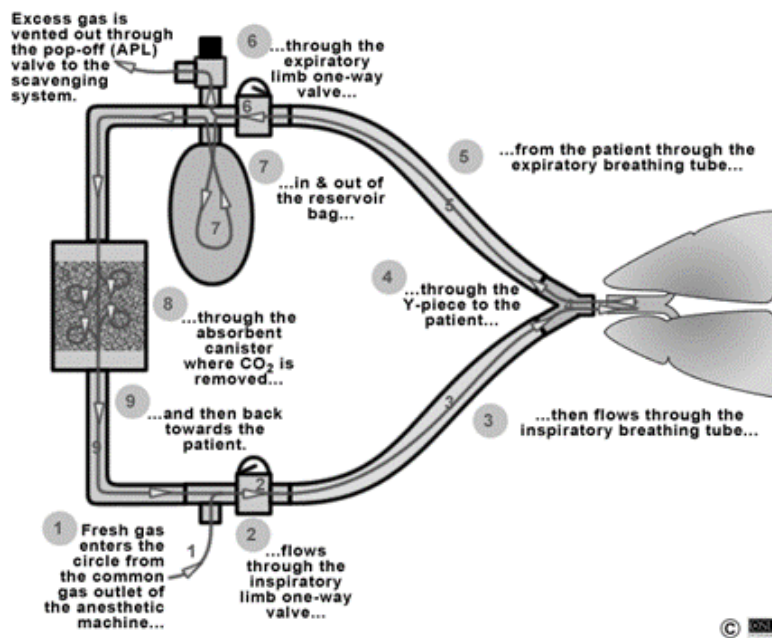
Sistem za disanje predstavlja komplet komponenti sastavljen uglavnom od cevi i jednosmernih ventila, koji ima zadatak da dostavi smesu kiseonika i inhalacionog anestetika do pacijenta (4,5,6).

*Otvoreni disajni krug* – Sistemi bez ponovnog udisanja gasova (*Non-rebreathing circuit*) i

*Zatvoreni disajni krug – Sistemi sa ponovnim udisanjem izdahnutih gasova (Rebreathing circuit)*

Sistemi bez ponovnog udisanja gasova (*Non-rebreathing circuit*) – Svež gas od aparata za inhalacionu anesteziju se preko isparivača i disajnih cevi doprema do pacijenta koji ga udiše. Izdahnuti gasovi se izbacuju u atmosferu ili preko izduvnog ventila. Najjednostavniji predstavnici ove grupe disajnih sistema su: *Ayre's T piece* sistem i najkorišćeniji *Bain circuit* sistem. Prednosti otvorenog sistema su: mali otpor kod disanja, mali mehanički mrtvi prostor (prostor u sistemu koji je ispunjen gasovima koji se ponovno udišu a bez da su prošli kroz absorbens ugljendioksida), jednostavnija konstrukcija i manja mogućnost kvara, jeftiniji sistemi, lakša manipulacija i održavanje, dugotrajnost. Nedostaci otvorenih sistema su: budući da nema ponovnog udisanja gasova, do pacijenta uvek stiže nova količina gasa koji je suv i hladan, znatno veća potrošnja anestetika i kiseonika.

Sistemi sa ponovnim udisanjem (*Rebreathing circuit*) – Kod ovih sistema izdahnuti gas se ponovno koristi nakon što se odstrani ugljendioksid pomoću hemijskih agenasa (absorbens). Organizovani su po principu tzv kružnog sistema. Kružni sistem (Slika 2.) se sastoji od sledećih komponenti: absorbens ugljendioksida, dva jednosmerna ventila, merača pritiska, dela za dovod svežeg gasa, izduvnog ventila, creva za disanje, Y račve i respiratornog balona.



**Slika 2.** Kružni (*Rebreathing*) sistem

## LITERATURA

1. Al-Shaikh B., Stacey S. *Essentials of Anesthetic Equipment*, 3rd ed. Churchill Livingstone, London, 2007.
2. American College of Veterinary Anesthesiologists. 1996. *Commentary and recommendations on control of waste anesthetic gases in the workplace*. *J Am Vet Med Assoc* 1996, 209:75–77.
3. Dorsch J.A., Dorsch S.E. *Understanding Anesthesia Equipment*, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1999.
4. Hall L.W., Clark K.W., Trim C.M. *Veterinary Anaesthesia*, 10th edn. WB Saunders, London, 2001.
5. Hartsfield S.M. *Anesthetic machines and breathing systems*. In *Lumb and Jones Veterinary Anesthesia*, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996
6. Muir W.W., Hubbel J.A.E., Skarda R.T., Bednarski R.M. *Handbook of Veterinary Anesthesia*, 3rd ed. Mosby, St. Louis, 2000.

## **PRIMENJEMA VETERINARSKA EPIDEMIOLOGIJA (Radionica)**

Aleksandar Potkonjak

<sup>1</sup>*Departman za veterinarsku medicinu – Laboratorija za dijagnostiku infektivnih bolesti i zoonoza,  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu  
\*kontakt: [ale@polj.uns.ac.rs](mailto:ale@polj.uns.ac.rs)*

### **Sažetak**

Veterinarska epidemiologija je poslednju deceniju pretrpela značajne revizije. Sama pojava novih oboljenja uz promenu faktora rizika za pojavu oboljenja i načina života ljudi, kao i razvoj tehnologije; uveliko su promenili definiciju, ciljeve i metode ove discipline. U našoj zemlji, do pre nekoliko godina, ovaj predmet nije ni postojao kao samostalan u univerzitetskim nastavnim planovima i programima. Kako međunarodne institucije (WHO, FAO, OIE, CDC i ECDC) zahtevaju primenu epidemioloških znanja i umenja, neophodno je dodatno obrazovanje nastavnika u srednjim školama i republičkih veterinarskih inspektora. U nastavni plan i program stručnih predmeta za obrazovni profil veterinarski tehničar, u srednjim školama, je uključen predmet epizootologija (arhaični naziv za veterinarsku epidemiologiju), sa vrlo ograničenim i zastarelim metodskim jedinicama koje predaju nastavnici. Republički veterinarski inspektori, prevashodno rade na suzbijanju infektivnih oboljenja životinja i kontroli higijenske ispravnosti namirnica. Stručnu osnovu za ovaj posao predstavlja veterinarska epidemiologija. Po završetku kursa polaznici treba da budu sposobni da primene osnovne principe veterinarske epidemiologije i unaprede svoje profesionalne aktivnosti.

Ključne reči: Veterinarska epidemiologija

### **Abstract**

In the last decade Veterinary epidemiology suffered significant revisions. The mere appearance of new diseases with changing of risk factors for the emergence of diseases and lifestyles of people, as well as technology development; greatly changed the definition, objectives and methods of the discipline. In our country, a few years ago, this subject did not exist as an independent in university curricula. As international institutions (WHO, FAO, OIE, CDC and ECDC) require the application of epidemiological knowledge and skills, additional education of teachers in secondary schools and republic veterinary inspectors is necessary. In the curriculum of vocational subjects for the educational profile of a veterinary technician, in secondary schools, subject Epizootiology is included (an archaic term for Veterinary Epidemiology), with a very limited and obsolete methodical units taught by teachers. Republic veterinary inspectors, primarily work on eradication of infectious diseases of animals and control of hygienic quality of food. Technical basis for this work presents veterinary epidemiology. Upon completion of the course students should be able to apply the basic principles of veterinary epidemiology and improve their professional activities.

Key words: Veterinary epidemiology

### **Koncept, opis i sadržaj radionice**

1. Značaj međunarodnih organizacija

Dat je pregled i značaj OIE, WHO, ECDC i WTO.

2. Prijava i odjava infektivnih oboljenja

Objašnjen je pravilnik, kao ipostupak za prijavu i odjavu zaraznih bolesti

3. Teorija uzroka i posledica

Epidemiologija predstavlja jedinstven primer koji povezuje društvene i prirodne nauke. U definisanju uzroka oboljenja epidemiologija je evoluirala od od monokauzaliteta (jedan uzrok oboljenja) do multikauzaliteta (mreža složenih odnosa više uzroka oboljenja). Pojam ove mreže složenih odnosa više uzroka oboljenja imitira, slične i prethodno definisane principe u društvenim naukama. Međutim u poređenju sa društvenim naukama, epidemiologija je mnogo osetljivija za osnovne biološke modele, kao i sklonija pojednostavljanju uzročno-posledične veze. Paradoksalno, epidemiologija je u cilju identifikovanja pojedinačnih protektivnih faktora razvila sofisticiranije teorijske modele za prepoznavanje pristrasnosti i identifikaciju zbunjujućih faktora u istraživanju u odnosu na društvene nauke. Upravo zato se češće u istraživanju koriste studije posmatranja u odnosu na eksperimentalne studije ili ankete.

Uzročnost, odnosno kauzalitet se bavi odnosima između uzroka i posledica. U latinskom jeziku kauza (lat. causa) označava uzrok, razlog, povod ili pobudu, dok kauzalitet (lat. causalitas) označava uzročnost, uzročnu vezu ili odnos između uzroka i posledice. Osnovno pitanje je šta mi podrazumevamo pod kauzalnošću? Čak i među ljudima koji izučavaju kauzalitet kao objekat istraživanja, sam koncept se u velikoj meri oslanja na prethodno lično iskustvo. U periodu mladosti, svaka osoba razvija i proverava različita objašnjenja uzroka proživljenih iskustava, što vodi ka većoj kontroli sličnih događaja koji bi se mogli dogoditi u budućnosti. Naša prva spoznaja koncepta kauzaliteta se zasniva na sopstvenim direktnim zapažanjima, te stoga je i ishod koncepta kauzaliteta ograničen na obim posmatranja. Mi obično posmatramo posledice i uzroke koji su odmah očigledni, međutim kompletan uzročni mehanizam je mnogo složeniji.

Kauzalitet u medicinskim naukama se može posmatrati iz najmanje tri perspektive. Jedna se odnosi na klasično epistemološko pitanje kako je uzrok otkriven i koji je najefikasniji model objašnjenja. Ova perspektiva uključuje koncept „luka znanja“ odnosno uloge definisanja odgovarajuće hipoteze i njenje provere. Druga perspektiva se odnosi na teret dokazivanja koji treba da razmotri da li je uzrok odgovoran za oboljenje i koliko je dokaza potrebno prikupiti. Treća perspektiva se odnosi na način tumačenja odnosa između uzroka i posledica, na primer u različitim modelima (deterministički i stohastički).

Epidemiološka istraživanja se u velikoj meri odnose izlaganje specifičnih tipova individua prema specifičnim tipovima okruženja. U tom smislu epidemiolozi teže da uoče to izlaganje i procene njegovu vezu sa ishodima (npr. zdravlje, dobrobit, produktivnost) u cilju unapređenja života životinja i njihovih vlasnika. U osnovi se radi o uzročno-posledičnoj povezanosti u prirodi, koja kada se jednom ustanovi, može da se iskoriti za unapređenje zdravlja, dobrobiti i produktivnosti životinja, odnosno kvaliteta i zdravstvene ispravnosti namirnica.

Uzročno-posledična povezanost izlaganja određenim faktorima sa ishodom postoji kao deo složene mreže odnosa između životinja i svih aspekata njihovog okruženja. Upravo zato se epidemiolozi trude da unaprede dizajn epidemioloških studija i analizu dobijenih podataka, kako bi što bolje opisali ovu mrežu složenih odnosa više uzroka oboljenja. Jedino istraživanjem ove povezanosti u prirodnim uslovima, odnosno realnom životu, moguće je da se razume i objasni ova mreža mreža složenih odnosa više uzroka oboljenja.

#### Uzročno-posledično zaključivanje

Prvo i teško pitanje je šta je to uzrok? Jedan od odgovora je da je uzrok nešto što ima posledicu. U epidemiologiji pod uzrokom može da se podrazumeva nešto što menja učestalost pojave oboljenja, stanje zdravlja ili povezane faktore u populaciji. Ova pragmatična definicija uzroka, dovoljna je za epidemiološka istraživanja, ali ne treba izgubiti iz vida da filozofi hiljadama godina ulažu napore od objasne prirodu kauzalnosti.

Potrebno je znati da se uzrok ne može logički izvesti iz činjenice da su dva događaja povezana. Jednostavno grom se javlja posle munje, ali to ne znači da je grom izazvan pojavom munje. Posmatrajući ove povezane pojave milion puta, te ne mora da bude istina. Fizičari su objasnili da su grom i munja deo iste pojave (atmosfersko električno pražnjenje), samo se munja vidi pre nego što se čuje grom jer svetlo putuje brže od zvuka. U epidemiologiji je dobro poznat aksiom „povezanost ne znači kauzalitet“. Zato za uzročno-posledično zaključivanje nije dovoljno samo posmatranje, nego je neophodno i razumevanje.

Epidemiološki pristup uzročno-posledičnom zaključivanju sastoji se od vrednovanja potencijalnih uzroka iz dva nekumulativna ugla. Prvi ugao se odnosi na rezultate dobijene u komparativnim, eksperimentalnim ili studijama posmatranja, dok se drugi ugao odnosi na razmatranje neepidemioloških dokaza. To ne podrazumeva izjave o statističkoj značajnosti.

Naučni zaključci se izvode primenom indukcije i dedukcije. Induktivno zaključivanje se odnosi na proces stvaranja generalizovanih zaključaka o uzroku oboljenja na osnovu ponovljenih zapažanja. Dva dobra primera za induktivno uzročno posledično-zaključivanje o uzroku oboljenja su dali Džon Snou i Edvard Džener. Obojica su rešila vrlo značajne zdravstvene probleme. Džon Snou je korektno ustanovio izvor infekcije i mehanizam širenja kolere u Londonu 1854. godine, dok je Edvard Džener zapazio da mužačice obolele od mužačkih kvržica ne mogu da se zaraze virusom velikih boginja, te je na osnovu tog zapažanja 1796. godine razvio efikasnu vakcinu protiv velikih boginja. Indukcija predstavlja osnov modernog naučnog istraživanja jer zahteva zasebno posmatranje događaja, i često je u vezi sa „pozivitizmom“, odnosno filozofskim terminom koji opisuje naučne studije koje se baziraju na objektivnoj analizi podataka i isključuju neproverene spekulacije. Ovaj pristup koji generiše „instrumentalno znanje“ je postao sinonim za moderan naučni metod, ali on predstavlja samo jedan od načina sticanja saznanja i ne može da predstavlja „celu sliku“. Dobar primer za induktivno zaključivanje je pojava slinave i šapa u Velikoj Britaniji 2001. godine, kada su epidemiološka istraživanja na terenu otkrila nedokazanu sumnju da se oboljenje proširilo ilegalnim transportom stoke i tako pružila potpuniji uvid u transmisiju oboljenja. Ovo ukazuje i na to da pozitivizam isključuje moralne i etičke sudove (npr. o socijalnim i psihološkim efektima primene mera kontrole pojedinih oboljenja) koji su jedino mogući refleksijom „kritičkog znanja“. Deduktivno zaključivanje se odnosi na proces donošenja zaključka do postoji opšti „zakon prirode“ i da ima određenu primenu na pojedinačnom ili lokalnom slučaju. Proces započinje sa postavljanjem hipoteze i posledičnim zapažanjima da se hipoteza dokaže ili ospori. Razvoj „skepticiizma“ u osamnaestom veku karakteriše deduktivno zaključivanje. Iako su ideje Dejvida Hjuma važne za razvoj kauzaliteta u epidemiološkom smislu, one su i danas predmet rasprave. Hume tvrdi da samo zapažanje da jedan događaj prethodi drugom nije dokaz da je prethodni događaj prouzrokovao naknadni, jer prvo, čak i ako je ovo zapaženo više puta, ne može se isključiti slučajnost i drugo, prethodni uočeni obrasci ne mogu garantovati da će se pojaviti i u buduće.

Tomas Bajes je uneo novi koncept u epidemiološko izučavanje uzročno-posledične veze. Smatrao je da su svi oblici zaključaka zasnovani na validnosti postavljenih premisa, kao i da ni jedan zaključak ne može biti zasigurno poznat. On je istakao da zaključci ne mogu da postoje u vakuumu i da činjenice koje imamo pre niza posmatranja utiču na naše tumačenje tih zaključaka o uzrocima. On je prvi induktivno primenio statističku verovatnoću. Njegov metod podrazumeva izračunavanje učestalosti pojave događaja u prošlosti i verovatnoće da će se isti događaj pojaviti u budućnosti. Bayesov pogled na verovatnoću predstavlja način registrovanja stepena verovanja koji mogu biti ojačani ili oslabljeni brojčanim podacima. Dobar primer primene Bayesovog metoda je izračunavanje verovatnoće pojave oboljenja kod individue, bez obzira na rezultate dijagnostičkih testova.

Značajnu promenu u uzročno-posledičnom zaključivanju je uneo Karl Poper izjavom da naučna hipoteza nikada ne može biti dokazana ili ocenjena kao istinita, ali da dokazi mogu da ukažu da je lažna.

U epidemiološkim istraživanjima uzročnosti, glavna korist Poperovog pristupa se odnosi na pažljivi pregled već poznatih činjenica, nakon čega se postavlja vrlo specifična hipoteza i testira sa ograničenim i fokusiranim brojem dokaza za pobijanje. Na taj način se izbegava primena preobimnih epidemioloških upitnika.

U skorije vreme Tomas Kun je ukazao da iako jedno zapažanje može da obori hipotezu, ona i dalje može biti tačna u mnogo drugih situacija. Kuhnovo zapažanje otvara prostor za konsenzus u naučnom mišljenju i zato je značajno. Hipoteza o uzročno-posledičnoj vezi može da se potvrdi ili odbaci na osnovu četiri metoda: čvrstina, autoritet, intuicija i naučno istraživanje.

#### 4. Tipovi epidemioloških studija

Dat je pregled tipova studija, njihov značaj i indikatori koji mogu da se izračunaju

5. Incidencija, prevalencija, morbiditet, mortalitet, letalitet



Incidencija je broj novih slučajeva koji se javljaju u datoj populaciji tokom nekog određenog vremenskog perioda, Stepennost incidencije je mera brzine kojom se novi slučajevi bolesti javljaju u toku vremena, Prevalencija je broj slučajeva oboljenja ili jedinki koje poseduju specifična antitela u datoj populaciji u određenom vremenskom periodu, Morbiditet: ukupan broj obolelih jedinki u populaciji, Mortalitet: ukupan broj uginulih jedinki u populaciji, izračunava se KM i M, Letalitet: predstavlja verovatnoću da obolela životinja uginu,  $L = \text{broj uginuća} / \text{broj obolelih životinja}$

#### 6. Definisane tipa i veličine uzoraka

Tri osnovna tipa veličine uzorka: Uzorkovanje u cilju dokazivanja oboljenja u populaciji, Uzorkovanje u cilju procene prevalencije ishoda u populaciji, Veličina uzorka za testiranje hipoteze.

Napredni metodi-detekcija oboljenja: Korekcija za ne savršenu osetljivost i specifičnost, Bajesov metod kada nema zlatnog standarda, Metode za klasifikaciju "slobodan od oboljenja"

#### 7. Epidemiološki upitnik

Epidemiološki upitnici jedan su od najčešće korišćenih alata za prikupljanje podataka u veterinarskim epidemiološkim istraživanjima. Sastavljanje epidemiološkog upitnika je kompleksan proces koji uključuje mnoge aspekte njegovog dizajna.

##### Ciljevi ispitivanja

Da bi upitnik bio efektivan, mora biti dobro planiran sa pažnjom posvećenom brojnim elementima njegovog dizajna. Pre svega, neophodno je da se definišu ciljevi i potrebe za podacima koji se prikupljaju u istraživanju. Ovaj proces može uključiti i konsultacije sa ekspertima iz pojedinih oblasti, kao i sa krajnjim korisnicima informacija. U ovoj fazi planiranja takođe bi trebalo da budu konsultovani i sami učesnici u istraživanju. Objavljeni upitnici iz prethodno sprovedenih istraživanja u istoj oblasti mogu biti naročito vredni, ako je sprovedena formalna validacija valjanosti upitnika, što u istraživanjima koja se tiču zdravlja životinja često nije slučaj.

##### Tipovi upitnika

Upitnici mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Kvalitativni upitnici mogu biti korišćeni u fazi kreiranja hipoteze istraživanja kada je potrebno identifikovati sve probleme koji se odnose na istraživanu temu. Kvantitativni upitnici, ili strukturirani upitnici su dizajnirani da prikupe informacije o životinjama, njihovom okruženju, načinu njihovog držanja i sl. Ovakav tip upitnika mnogo češće se koristi u veterinarskoj epidemiologiji nego kvalitativni upitnici.

##### Načini primene upitnika

Upitnici mogu biti primenjeni preko „licem u lice“ intervjua, telefonskih intervjua, putem e-maila, ili preko interneta. Intervjui „licem u lice“ obezbeđuju direktnu interakciju ispitivača i ispitanika. Prednosti ovog tipa intervjua su da svrha istraživanja može biti u potpunosti obašnjena, može biti obezbeđen visok procenat učešća, kao i da mogu biti korišćena audio-vizualna pomagala. Ovakav tip intervjua takođe pomaže razvijanju dobrog odnosa između ispitivača i učesnika koji bi mogao biti važan ako je potrebno kontinuirano učešće u istraživanju. Nedostaci ovakvog pristupa su da zahteva puno vremena, skup je, geografski ograničen na područja koja su bliža ispitivačima i može biti izvor grešaka uzorkovanih pristrasnošću ispitivača. Poslednji nedostatak može biti izbegnut, bar delimično, pažljivom obukom ispitivača.

Telefonski intervjui imaju mnogo zajedničkih prednosti s intervjuima „licem u lice“ (visok odziv, mogućnost objašnjenja istraživanja), ali su manje skupi i zahtevaju manje utrošenog vremena. Pitanja treba da su što kraća kako bi se vreme razgovora svelo na minimum. Takođe, mogu biti manje osetljivi na greške ispitivača nego „licem u lice“ intervjui (npr. ne mogu se dati vizualni znaci), ali su ograničeni u smislu vremena koje ispitanik ima na raspolaganju za upitnik. Postoje i mnogi nedostaci telefonskih intervjua koji bi trebalo da budu razmotreni, kao što je npr. mogućnost da potencijalni učesnici u istraživanju nemaju telefonski broj.

Upitnici poslani putem e-maila često se koriste jer su jeftini i s obzirom da ih popunjava ispitanik nemaju potencijala za greške od strane ispitivača. Takođe, slanje upitnika putem e-maila je lako i brzo se organizuje. Ipak, ovakav vid primene upitnika ima naveću podložnost slabom odazivu ispitanika, ali ne postoji ni mogućnost kontrole ko ih popunjava. Međutim, mogućnost da ispitanici anonimno odgovore može povećati stopu odziva na ovakav tip upitnika. Greške u izboru su ozbiljan razlog za zabrinutost ako

je odziv ispitanika nizak, ali mogućnost relativno lakog prikupljanja podataka iz veoma različitih populacija, e-mail upitnike čini pogodnim za mnoga istraživanja.

Internet upitnici su najsavremeniji tip upitnika i mogu biti još jeftiniji i od e-mail upitnika. Imaju i dodatnu prednost da odovori odlaze direktno u elektronsku bazu podataka bez potrebnog kodiranja i unosa podataka. Ovaj tip upitnika osim veb-zasnovanih upitnika uključuje i podatke prikupljene putem personalnih digitalnih aparata, smart i mobilnih telefona, kao poslednjih vidova tehnika primjene upitnika. Ipak, internet upitnici pate od sličnih nedostataka kao i e-mail upitnici i primenjivi su samo u slučaju da ispitanici imaju pristup internetu. Dodatna pažnja treba biti posvećena kontroli popunjavanja, u smislu da isti ispitanik ne može više puta popuniti upitnik. Međutim, sve prednosti internet upitnika i njihov dalji razvoj teoretski predstavljaju budućnost u prikupljanju epidemioloških podataka.

#### 8. Epidemiološki uviđaj

Izbijanje zaraznog oboljenja je niz događanja grupisanih u vremenu. Obično se detektuje jedna od komponenti iz sistema nadzora (prijava vlasnika). Epidemiološki uviđaj se sprovodi kao odgovor na izbijanje zaraznog oboljenja. Cilj je da se: razumeju uzroci i identifikuju metode za kontrolu i sprečavanje budućih dešavanja. Epidemiološki uviđaj ima značajan uticaj na javno zdravlje. Obavljaju multidisciplinarni timovi, koji uključuju kliničke, laboratorijske, epidemiološke i druge relevantne ekspertize.

#### 9. E-learning: rešavanje epidemioloških problema

### **Zahvalnost**

Rad je rezultat projekta Building capacity of Serbian Agricultural Education to link with Society (CASA), 544072-TEMPUS-1-2013-1-RS-TEMPUS-SMHES, koji finansira EU komisija, TEMPUS projekti, period realizacije 2013 – 2016. Radionica je akreditovan program obuke kod Veterinarske komore Srbije za programiranu edukaciju veterinaru u 2018. i 2019. godini i vrednovan je sa 16 bodova (Odluka broj 1/3 od 15.03.2018).

### **Literatura**

1. *Thrusfield M. Veterinary epidemiology. Third edition, Wiley-Blackwell, 2007.*
2. *Dohoo I. et al. Veterinary Epidemiologic Research, First edition, AVC Inc., 2003.,*
3. *TomaB. et al. Dictionary of veterinary epidemiology. First edition, Iowa State University Press, 1999.*

## **RACIONALNA PRIMENA ANTIBIOTIKA KOD FARMSKIH ŽIVOTINJA (Radionica)**

Miodrag Radinović, Zorana Kovačević

*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

*Kontakt: [miodrag.radinovic@polj.edu.rs](mailto:miodrag.radinovic@polj.edu.rs)*

Na kojim se teorijskim osnovama program zasniva?

Rezistencija na antibiotike predstavlja globalni zdravstveni problem kao jedna od najvažnijih pretnji za bezbednost hrane, zdravlje ljudi i životinja. Ona predstavlja alarmantni problem 21. veka u humanoj i veterinarskoj medicini obzirom da je povećana rezistencija bakterija na antibiotike povezana sa povećanim mortalitetom od opasnih infekcija i povećanim troškovima zdravstvene zaštite. Naime, procenjuje se da godišnje u svetu umre čak 700.000 ljudi kao posledica neefikasne terapije antibioticima. Kao rastući problem širom sveta, antimikrobna rezistencija se u određenoj meri odnosi i na nedostatak znanja o ovoj temi među zdravstvenim radnicima. Kada je u pitanju primena antibiotika, za sam nastanak bakterijske rezistencije izdvajaju se sledeći faktori: ukupna upotreba antibiotika, optimalan režim doziranja (doziranje, farmakokinetika i farmakodinamija leka), kao i mogućnost prenošenja rezistentnih sojeva. U današnje vreme praktično je nemoguće zamisliti intenzivnu proizvodnju bez primene antibiotika kako u cilju terapije, tako i u profilaktičkom smislu. Kad se radi o govedarstvu održavanje dobrog zdravstvenog statusa zahteva angažovanje struke i primenu terapeutika u različitim fazama proizvodnog ciklusa kod različitih kategorija. Tako u zapaštima tovine junadi najveća primena antibiotika je u cilju kontrole respiratornog sindroma. U ovim uslovima, a posebno kad su u pitanju veliki zapati antibiotici se mogu aplikovati peroralno i to kroz vodu za piće što ima brojne prednosti. U zapaštima muznih krava najveća upotreba antibiotika je u cilju kontrole i terapije mastitisa. Bez obzira na različite pristupe u različitim uslovima proizvodnje kontrola mastitisa predviđa rad na prevenciji a u slučaju pojave mastitisa terapiju kliničkih mastitisa u fazi laktacije a subkliničkih u fazi zasušenja. Ovo su opšte smernice i izbor adekvatne terapije zavisi od svakog konkretnog slučaja. Potrebno je uzeti u obzir ozbiljnost oboljenja, lokalne promene i promene opšteg stanja, izgleda na uspeh terapije, trošak terapije i karencu za mleko i meso. Antimikrobna terapija je ključna komponenta u kontroli mastitisa u sistemu proizvodnje mleka, najčešće se koriste sledeće grupe lekova: penicilini, sulfonamidi, hinoloni i aminoglikozidni antibiotici. Pored antimikrobne terapije tretman mastitisa može da uključuje i druge farmakološke grupe lekova kao što su nesteroidni antiinflamatorni lekovi kortikosteroidi, vitamini, citokini, vakcine.

U čemu se ogleda savremenost programa?

Obzirom da je rezistencija bakterija na antibiotike direktno povezana sa nepravilnom upotrebom antibiotika u globalnom akcionom planu Svetske zdravstvene organizacije (SZO) o antimikrobnoj rezistenciji ističe se važnost edukacije zdravstvenih radnika o upotrebi antibiotika i antimikrobnoj rezistenciji (Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015).

Kao jedan od najčešće predloženih pristupa je preduzimanje edukativnih kampanja među zdravstvenim radnicima čime je moguće uticati na povećanje nivoa svesti o opasnosti antimikrobne rezistencije za javno zdravlje.

U terapiji mastitisa krava, antibiotici su često neophodni u cilju postizanja etiološkog izlečenja. Treba, ipak imati na umu da nije svaka aplikacija antibiotika doprinos terapiji te da neadekvatna primena ili predoziranje može imati i štetne posledice. Te posledice se ogledaju kroz direktno oštećenje parenhima vimena dejstvom aktivnih supstanci iz preparata i ovo može imati za posledicu povišen broj somatskih ćelija u mleku i nakon izlečenja. Način aplikacije leka može uticati na trajanje karence, lekovi namenjeni za intramuskularnu aplikaciju se često aplikuju intramamarno što može dovesti do dužeg prisustva rezidua u mleku. Povećanje rezistencije mikroorganizama je takođe posledica neadekvatne terapije. Zbog ovoga antibiotike treba primenjivati prema uputstvu, ispoštovati način aplikacije i dozu leka. Poželjno je terapiju

odrediti na osnovu antibiograma mada kod kliničkih mastitisa zbog akutnog stanja nema dovoljno vremena te se lek odabira empirijski. U cilju manjeg utroška leka i postizanja terapijske koncentracije u optimalnom roku poželjno je birati intramamarni način aplikacije. Ovo je moguće kada mastitis ne prati poremećaj opšteg stanja životinje.

Na koji je način utvrđena potreba za obukom? Navedite pokazatelje potrebe za ponuđenim programom obuke.

U Republici Srbiji se od 2010. godine antibiotici kod domaćih životinja koriste isključivo u terapijske i metafilaktičke svrhe i zabranjena je njihova primena kao stimulatora rasta. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije (ALIMS), shodno obavezama koje su utvrđene Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima, prikuplja i obrađuje podatke o prometu lekova, sa ciljem da omogući uvid u obim i vrste lekova koji su korišćeni u Republici Srbiji. Prema podacima ALIMS-a, ukupan promet antimikrobnih lekova u Republici Srbiji za 2014. godinu je iznosio 76475,61, za 2015. godinu 76481,06 i za 2016. godinu 75520,41 kilograma aktivnih supstanci. I pored apela svim zdravstvenim radnicima, uključujući i veterinare o racionalizaciji upotrebe antibiotika, promet antimikrobnih lekova u našoj zemlji se ne menja. Edukacijom veterinarima o pravilnoj i racionalnoj upotrebi antibiotika moguće je uticati na smanjenje potrošnje antibiotika u našoj zemlji.

Učestalost pojave mastitisa se u mnogome razlikuje od farme do farme. Postoje neke prosečne odnosno prihvatljive vrednosti za kliničke i subkliničke mastitise. Osim učestalosti bitno je i koji su uzročnici u pitanju i kakve promene na parenhimu su izazvali. Učestalost kliničkih mastitisa na mesečnom nivou ne bi trebalo prelaziti 2%. Subklinički mastitisi su prisutni u većem procentu i u datom trenutku ne bi trebalo da prelaze 30%. Sve vrednosti preko ovih su znak za uzbunu i hitnu intervenciju. Gubici nastali zbog mastitisa su brojni, vrednosti variraju zavisno od uzročnika, trajanja i ishoda terapije. Najveći deo gubitka, i do 70% je zbog odbačenog mleka za vreme terapije i za vreme trajanja karenca. Tu je još trošak same terapije, smanjene proizvodne sposobnosti plotkinje, nekad gubitak četvrti ili celog vimena i naravno direktna uginuća koja se mogu javiti kod nekih formi mastitisa. Neadekvatna terapija mastitisa predstavlja još veći gubitak jer izostaje pozitivan fekat izlečenja, produžava se karenca i povećava verovatnoća nastanka oštećenja parenhima vimena.

Koji su opšti ciljevi programa? Koji su specifični ciljevi programa?

Opšti ciljevi programa su smanjenje upotrebe antibiotika i smanjenje antimikrobne rezistencije, kao i mogućnost za smanjenje pojave kliničkih i učestalosti subkliničkih mastitisa kroz mere kontrole i nadzora. Specifični ciljevi programa su razumevanje novih saznanja o racionalnoj (mudroj) upotrebi antibiotika, kao i razumevanje značaja drugih terapeutika u terapiji mastitisa koji će zajedničkom primenom povećati efikasnost samih antibiotika u cilju eliminacije intramamarnih infekcija u veterinarskoj praksi. Kroz razumevanja nabrojanih problema, veterinarima će biti omogućen lakši rad uz racionalniju i pravilniju farmakoterapiju.

Zahvalnost

Radionica je rezultat Promis projekta Intramammary ethno-veterinary formulation in prevention and treatment of bovine mastitis for optimization of antimicrobial treatment (InfoBomat) Fonda za nauku R.Srbije.