ISSN: 2683-5932
ISSN(Online): 2683-5924
Web: http://www.nsveterina.edu.rs/publikacije/casopisi/
Kontakt: vetpregled@gmail.com

~ VETERINARSKI PREGLED ~

NAUČNI ČASOPIS DEPARTMANA ZA VETERINARSKU MEDICINU NOVI SAD

~ VETERINARY REVIEW ~

SCIENTIFIC JOURNAL OF THE DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE NOVI SAD

Vol 2 **No 1** **Jun/June 2021**

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

619

VETERINARSKI pregled : naučni časopis Departmana za veterinarsku medicinu Novi Sad = Veterinary review : scientific journal of the Department of Veterinary Medicine Novi Sad / glavni i odgovorni urednik Aleksandar Potkonjak. - Vol. 2, no. 1 (jun 2021)- .
- Novi Sad : Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2021- . - 25 cm

Godišnje. - Dostupno i na:
http://www.nsveterina.edu.rs/publikacije/casopisi/ = Veterinarski pregled (Online) = ISSN 2683-5924

ISSN 2683-5932 = Veterinarski pregled

COBISS.SR-ID 14813961

VETERINARSKI PREGLED

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

Glavni i odgovorni urednik: Prof.dr Aleksandar Potkonjak

Zamenik urednika: Prof.dr Ivan Stančić

Sekretar: dr. vet. Ivan Galić, asist.

Uređivački odbor:

Prof.dr Dragica Stojanović, Srbija
Prof.dr Romana Turk, Hrvatska
Prof.dr Miodrag Radinović, Srbija
Prof.dr Bojan Toholj, Srbija
Prof.dr Marko Cincović, Srbija
Prof.dr Nikolina Novakov, Srbija
Prof.dr Jože Starič, Slovenija
Prof.dr Ramiz Ćutuk, BiH
Prof.dr Radojica Đoković, Srbija
Doc.dr Jožica Ježek, Slovenija
Prof.dr Ozren Smolec, Hrvatska
Prof.dr Zdenko Kanački, Srbija
Prof.dr Romeo Teodor Cristina, Rumunija
Prof.dr Bojan Blagojević, Srbija
Prof.dr Plamen Trojačanec, Severna Makedonija
Prof.dr Slavča Hristov, Srbija
Prof.dr Senad Prašović, BiH
Doc.dr Nenad Stojanac, Srbija
Doc.dr Ognjen Stevančević, Srbija

Predsednik izdavačkog saveta: Prof.dr Nedeljko Tica, dekan Poljoprivrednog fakulteta

Izdavački savet:

Prof.dr Nada Plavša
Prof.dr Dragan Rogan
Prof.dr Ljubica Spasojević Kosić
Prof.dr Vesna Lalošević
Prof.dr Slobodan Stojanović
Prof.dr Ivana Davidov
Prof.dr Božidar Savić
Doc.dr Mihajlo Erdeljan
Doc.dr Stanislav Simin
Prof.dr Marija Pajić
Doc.dr Jovan Spasojević
Doc.dr Annamaria Galfi
Doc.dr Ljiljana Kuruca
Doc.dr Bojana Vidović
Doc.dr Vuk Vračar
Doc.dr Zorana Kovačević

Predmet časopisa: Časopis objavljuje naučne i stručne radove iz oblasti veterinarske medicine i srodnih disciplina.
Jezik radova: Srpski (sa engleskim apstraktom) ili Engleski (sa srpskim sažetkom) po želji autora.
Periodičnost: Jedna sveska godišnje
Vrste radova: Originalni radovi, Pregledni radovi, Meta-analize, Radovi iz istorije veterinarske medicine, Radovi iz oblasti veterinarskog obrazovanja, Prikaz slučaja, Prikaz tehničkih rešenja, Prikazi knjiga, Naučna kritika, Pisma uredništvu, Izveštaji sa seminara i drugih stručnih događaja.
Format: Časopis izlazi u štampanoj/elektronskoj formi i biće publikovan na sajtu Departmana za veterinarsku medicinu
Prijava radova na mejl: vetpregled@gmail.com

DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU
Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

20 godina
2000-2020

Vivat Medicina Veterinaria Universitatis Studiorum Neoplantensis

VETERINARY REVIEW

Publisher: Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad,Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Editor-in-Chief: Prof.dr Aleksandar Potkonjak

Deputy Editor: Prof.dr Ivan Stančić

Secretary: dr. vet. Ivan Galić, asist.

Editorial Board:

Prof.dr Dragica Stojanović, Serbia
Prof.dr Romana Turk, Croatia
Prof.dr Miodrag Radinović, Serbia
Prof.dr Bojan Toholj, Serbia
Prof.dr Marko Cincović, Serbia
Prof.dr Nikolina Novakov, Serbia
Prof.dr Jože Starič, Slovenia
Prof.dr Ramiz Ćutuk, BiH
Prof.dr Radojica Đoković, Serbia
Doc.dr Jožica Ježek, Slovenia
Prof.dr Ozren Smolec, Croatia
Prof.dr Zdenko Kanački, Serbia
Prof.dr Romeo Teodor Cristina, Romania
Prof.dr Bojan Blagojević, Serbia
Prof.dr Plamen Trojačanec, North Macedonia
Prof.dr Slavča Hristov, Serbia
Prof.dr Senad Prašović, BiH
Doc.dr Nenad Stojanac, Serbia
Doc.dr Ognjen Stevančević, Serbia

President of the Publishing Council: Prof.dr Nedeljko Tica, Dean of the Faculty of AgriculturePublishing

Council:

Prof.dr Nada Plavša
Prof.dr Ljubica Spasojević Kosić
Prof.dr Vesna Lalošević
Prof.dr Slobodan Stojanović
Prof.dr Ivana Davidov
Prof.dr Božidar Savić
Doc.dr Mihajlo Erdeljan
Doc.dr Stanislav Simin
Prof.dr Marija Pajić
Doc.dr Jovan Spasojević
Doc.dr Annamaria Galfi
Doc.dr Ljiljana Kuruca
Doc.dr Bojana Vidović
Doc.dr Vuk Vračar
Doc.dr Zorana Kovačević

Subject of the Journal: The Journal publishes scientific and professional papers in the field of veterinary medicine and related disciplines.
Language: Serbian (with English abstract) or English (with Serbian abstract).
Periodicity: One No per year
Papers: original papers, review articles, meta – analysis, papers from the history of veterinary medicine, papers in the field of veterinary education, case report, technical solutions, book, scientific polemic, letters to the Editor, reports from seminars and other professional events.
For m at: The journal is published in printed and electronic form and will be published on the website of the Department of Veterinary Medicine.
Manuscript submission: vetpregled@gmail.com

DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE
Faculty of Agriculture University of Novi Sad

20 YEAR S ANNIVERSARY
2000-2020

Vivat Medicina Veterinaria Universitatis Studiorum Neoplantensis

Sadržaj

UTICAJ KORIŠĆENJA SUPLEMENTA BIOTINA U ISHRANI KONJA NA KVALITET KOPITA
INFLUENCE OF THE USE OF BIOTIN SUPPLEMENT IN HORSE NUTRITION ON HOOF QUALITY
Mihajlo Erdeljan, Zorana Kovačević, Jovan Spasojević, Tijana Kukurić, Romana Arlov.....9

TUMOR TESTISA PSA KAO POSLEDICA KRIPTORHIZMA- PRIKAZ SLUČAJA
TESTICULAR TUMOR IN DOG AS A CONSEQUENCE OF CRYPTORCHIDISM- A CASE REPORT
Ivan Galić, Bojan Toholj, Ivan Stančić, Jovan Spasojević, Ivana Davidov, Tijana Kukurić, Sandra Nikolić, Nadežda Tešin, Nenad Popović ..... …21

UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA VREDNOSTI TNF-α, HAPTOGLOBINA I FIBRINOGENA KOD KRAVA U PERIPARTALNOM PERIODU
INFLUENCE OF NIACIN APLICATION ON TNF-α, HAPTOGLOBIN AND FIBRINOGEN VALUES IN COWS IN PERIPARTAL PERIOD
Kosta Petrović, Filip Štrbac, Dragica Stojanović.....26

TAUMATSKA KOAGULOPATIA U PASA
TRAUMATIC COAGULOPATHY IN DOGS
Ana Smajlović, Tina Hundrić, Bojan Toholj, Marko Cincović, Marko Pećin, Marija Lipar, Ozren Smolec…... 34

IN VITRO OVICIDAL ACTIVITY OF MIXTURE OF LINALOOL AND ESTRAGOLE AGAINST GASTROINTESTINAL NEMATODES OF SHEEP
IN VITRO OVICIDNA AKTIVNOST SMEŠE LINALOOLA I ESTRAGOLA PROTIV GASTROINTESTINALNIH NEMATODA OVACA
Filip Štrbac, Antonio Bosco, Alessandra Amadesi, Laura Rinaldi, Giuseppe Mangieri, Dragica Stojanović, Nataša Simin, Dejan Orčić, Ivan Pušić, Slobodan Krnjajić, Radomir Ratajac 49

UTICAJ APLIKACIJE SELENA (PROMTSELEN®) U PREPARTALNOM PERIODU NA POJAVU ZAOSTAJANJA POSTELJICE KOD PRVOTELKI
EFFECT OF SELENIUM APPLICATION (PROMTSELEN®) IN THE PREPARTAL PERIOD ON THE OCCURRENCE OF PLACENTAL RETENTION IN HEIFERS
Srđan Todorović, Zoran Ružić, Miodrag Radinović, Zdenko Kanački, Jovan Stanojević, Ivan Galić.....60

Redosled radova u sadržaju postavljen po abecednom redu prvog slova prezimena prvog autora rada

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 2, No1, 2021
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 378.147
Erdeljan et al., pp 9-20

UTICAJ KORIŠĆENJA SUPLEMENTA BIOTINA U ISHRANI KONJA NA KVALITET KOPITA

INFLUENCE OF THE USE OF BIOTIN SUPPLEMENT IN HORSE NUTRITION ON HOOF QUALITY

Mihajlo Erdeljan[a], Zorana Kovačević[a], Jovan Spasojević[a], Tijana Kukurić[a*], Romana Arlov[a]

[a]*Departman za veterinarsku medicinu – Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*
[a]*Department of veterinary medicine – Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*
**Autor za kontakt: tijana.kukuric@gmail.com*

SAŽETAK

Kopita čine glavni oslonac na kome konji stoje i njihov kvalitet direktno utiče na zdravlje nogu, kvalitet kretnji, opštu funkcionalnost konja i njegove potencijalne performanse. Istraživanje je sprovedeno u julu 2021. godine na prostoru konjičkog kluba ”Viking” na Čeneju. Uzorak ispitanika od 27 konja je prema datoj saglasnosti vlasnika konja i kvalitetu kopita podeljen na ekperimentalnu i kontrolnu grupu. Pre početka tretmana grla, izvršeno je inicijalno subjektivno ocenjivanje opšteg stanja kopita, kao i merenje gustine tj. čvrstoće kopita. Grla eksperimentalne grupe su tokom 60 dana, u okviru jednog obroka redovne ishrane, dobijala i biotin u definisanoj količini - prema uputima proizvođača od 5mg na dan. Jedinke kontrolne grupe primale su redovan obrok bez dodatka biotina. Po isteku trajanja tretmana, izvršeno je finalno ocenjivanje i merenje. Kod ocenjivanja opšteg stanja kopita subjektivnom ocenom, utvrđene su razlike između grla eksperimentalne i kontrolne grupe a u korist kontrolne grupe. Isto stanje evidentirano je i nakon delovanja tretmana u istraživanju. Analizom značajnosti razlikovanja gustine kopita konja eksperimentalne grupe, pre i nakon delovanja tretmana biotinom, utvrđeno je da je ista statistički značajna (pe =0,049). Nije utvrđena statistički značajna razlika između gustine kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe, na inicijalnom nivou (pe = 0,38) kao ni na finalnom nivou, nakon delovanja tretmana (pe = 0,92). Smanjeno razlikovanje gustine kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe (praćeno prosečnom vrednošću), može se pripisati povećanju iste kod konja eksperimentalne, a kao pozitivna posledica delovanja suplementacije biotinom. I pored svega, moguće je prihvatiti pozitivno delovanje biotina na gustinu kopita konja kod kratkoročne supementacije. Cilj rada jeste da se nakon analize rezultata na inicijalnom i finalnom merenju, primenom adekvatnih statističkih metoda obrade podataka, izvedu zaključci o eventualnim promenama kvaliteta kopita konja, nakon delovanja definisanog tretmana.

Ključne reči: biotin, kopita, kvalitet kopita, suplementacija

ABSTRACT

Hooves are the support on which horses stand and their quality directly affects the health of the legs, the quality of movement, the general functionality of the horse and its potential performance. The research was conducted in July 2021 on the premises of the equestrian club "Viking" at Čenej. The sample of 27 horses was divided into experimental and control groups according to the consent of the horse owners and the quality of the horse hooves. Before the beginning of the treatment, the initial assessment of the general condition of hooves was performed, as well as the measurement of the density, that is - hoof strength. Horses of the experimental group received biotin, within one meal, through a period of 60 days in a defined amount - according to the manufacturer's instructions of 5mg per day. Subjects of the control group received a regular meal without the addition of biotin.With treatment ending, the final evaluation and measurement was performed. When assessing the general condition of the hooves by subjective assessment, differences were found between the horses of the experimental and control groups and in favor of the control group. The same condition was recorded after the treatment in the study. Analysis of significance of the difference in the hoof density of horses in the experimental group, before and after the effect of biotin treatment, found that it was statistically significant (pe = 0.049). No statistically significant difference was found between the hoof density of the horses of the experimental and control groups, at the initial level (pe = 0.38) or at the final level, after the effect of the treatment (pe = 0.92). The reduced difference between the hoof density of the horses of the experimental and control groups (followed by the average value) can be attributed to the increase of the same in the horses of the experimental group, and as a positive consequence of the action of biotin supplementation. Despite everything, it is possible to accept the positive effect of biotin on the density of horses' hooves in short-term supementation. The aim of this paper is to analyze the results of the initial and final measurement, using adequate statistical methods of data processing, to draw conclusions about possible changes in the quality of horses' hooves, after the defined treatment.

Key words: pathophysiology, veterinary medicine, teaching methods, didactics, syllabus.

UVOD

Kopita predstavljaju glavni oslonac tela konja, stoga njihov kvalitet direktno utiče na zdravlje nogu, kvalitet kretnji, opštu funkcionalnost konja kao i njegove potencijalne performanse (1). Kako bismo osigurali zdravlje kopitnog zida i drugih kopitnih struktura, važno je obratiti pažnju na uslove držanja konja, higijenu kopita, redovno i pravilno korigovanje oblika i uglova kopita, ali i potkivanje, ishranu i suplementaciju konja (1, 2). Zid kopita, zajedno sa svim epidermalnim strukturama, zavisi od ishrane u osnovi dermisa. Da bi se osiguralo adekvatno snabdevanje hranjivim materijama, korijum je visoko vaskularizovan (3).

Procesi keratinizacije i rast kopitne rožine, zahtevaju energiju kao i druge keratinogene hranljive materije. Međutim, malo je poznato koji su to tačno zahtevi i za kojim hranljivim materijama. Iz studija drugih keratinoznih sistema, poput kose i vune, pretpostavlja se da postoje četiri glavne klase keratinogenih hranljivih materija. Uopšteno govoreći, to su energetska hraniva, proteini, minerali tj. elementi u tragovima i vitamini (4).

Istraživanjima utvrđeno je da kalorijski unos ima direktan efekat na skoro svaki metabolički put i fiziološku funkciju u telu. U svom istraživanju Butler i Hinc (5) su uočili da je rast zida kopita 50% veći kod ponija koji su hranjeni ad libitum, nego kod

ponija sa ograničenim unosom hrane. Nivo unosa proteina nije uticao na rast kopita, već je samo ukupan unos hrane uticao na to da su mladi poniji, hranjeni ad libitum, postigli veći rast od onih na ograničenom unosu. Energetski metabolizam i metabolizam proteina usko su povezani. Energija je potrebna za metabolizam proteina, ali je energija dostupna i iz katabolizma proteina (4, 5). Kada su u pitanju minerali i elementi u tragovima, glavni elementi koji imaju ulogu u procesu keratinizacije su bakar, cink i kalcijum (6, 7). Među vitaminima koji imaju uticaj na proces keratinizacije izdvajaju se vitamin B, vitamin B12, vitamin D3, vitamin K, tiamin, riboflavin, niacin, pantotenska kiselina, holin i askorbinska kiselina (4). Biotin, kao jedan od suplemenata, predstavlja vitamin iz grupe vitamina B, koji se koristi u suplemetnaciji konja, radi poboljšanja kvaliteta kopita. Zbog svoje lake apsorpcije pri oralnoj primeni i odsustva toksičnosti, čak i u velikim dozama, često se koristi u ispitivanjima, s ciljem procene uticaja manipulacije sastava ishrane na kvalitet rožine kopita (6, 7)Biotin je prisutan u mnogim biljkama, uključujući trave i žitarice, međutim obično je vezan za molekule koji mogu značajno uticati na njegovu bioraspoloživost pa je dostupnost biotina u većini žitarica, sa izuzetkom kukuruza, veoma niska (8, 9).Mikrobna sinteza biotina odvija se u buragu goveda i ovaca, koja im omogućava dobar pristup i usvajanje ovog vitamina. Međutim, sinteza biotina u zadnjim partijama gastrointestinalnog trakta monogastričnih životinja, kao što su konji, nije ista kao kod preživara. Nedostaci biotina stoga zavise od sastava hraniva, prirodnog oblika u kojem se biotin javlja i stepena do kojeg konj može iskoristiti biotin, koji proizvode crevne bakterije (7, 8). U današnje vreme, koncentrati zamenjuju značajan deo hraniva konja, pa je prisustvo vlakana u ishrani smanjeno, a to takođe može dovesti do smanjenog unosa biotina, što posebno predstavlja problem kod takmičarskih konja, koji provode manje vremena na ispaši (6, 8, 10). Normalan dnevni unos biotina iznosi od 2-3mg dnevno, a normalna koncentracija biotina u plazmi je od 200-300ng/L (8, 9).

Prema istraživanju, svinje hranjene hranom deficitiranom u biotinu, pate od gubitka težine, loše probave, dermatitisa i lezija kože i papaka. Iako se smatra da mikrobna flora u buragu goveda proizvodi dovoljno biotina, problemi sa papcima kod krava mogu se smanjiti dodatnim biotinom u ishrani (8, 11, 12). Istraživanja o nedostatku biotina kod konja je malo. Studije suplementacije biotinom kod konja su ograničene i uglavnom su se oslanjale na subjektivnu procenu male populacije (10, 11, 12).Analizom rezultata dostupne literature može se primetiti značaj i doprinos upotrebe biotina. Bufa i saradnici (10) u svom radu, utvrtdili su postojanje bržeg rast kopitne rožine kod konja tretiranih biotinom, u odnosu na konja iz kontrolne grupe. Takođe navode i da je utvrđen statistički značajan porast u čvrstoći tj. gustini kopitne rožine kod tretiranih konja. Sa druge strane, istraživanje Gejera i Šulca (13) pokazala su da nema značajne razlike u brzini rasta kopitne rožine, usled primene biotina, ali da postoji poboljšanje makroskopskog izgleda kopita kod konja iz eksperimentalne grupe. Svakako, za sigurne i trajne rezultate, neophodna je dugotrajna i konstantna primena suplementa, u odgovarajućoj količini (11, 14, 15). Josek i saradnici (14) navode u svom radu, na uzorku konja lipicanerske rase primarno primetne su meke bele linija i sklonost ka pucanju kopitne rožine, dok je posle tretmana biotinom, primetan vidan napredak u makroskopskom kvalitetu kopitne rožine. Koristeći polukvantitativni sistem za ocenjivanje promena u histologiji rožine kopita, takođe su utvrdili poboljšanje u stanju rožine kopita, kao odgovor na davanje biotina tokom perioda od 9 meseci. Gejer i Šulc (13) i Zenker i saradnici (11) istraživali su međusobni odnos mikroskopskih karakteristika, čvrstoće pri pucanju rožine, kvaliteta kopita konja i efekta dodavanja biotina, tokom određenog vremena. Obe studije sugerišu moguću povezanost iako nije dokazana statistička veza. Međutim, uticaj suplementacije biotina na odnos

između čvrstoće i mikroskopskih karakteristika je teško utvrditi. Gejer i Šulc (13) su primetili poboljšanje čvrstoće uz dodatak biotina nakon 8 meseci kod onih životinja za koje je prvobitno identifikovano da imaju „promenjenu“ rožinu. Posle 15 meseci, vrednosti čvrstoće su se približile vrednostima konja sa „nepromenjenom“ rožinom. Nasuprot tome, Zenker i saradnici (11) nisu primetili značajne razlike u čvrstoći unutar ili između grupa nakon suplementacije od 19 meseci, uprkos histološkom poboljšanju u pogledu mikro-pucanja koje je primećeno u grupi tretiranoj biotinom, u ovoj fazi ispitivanja. Definitivni zaključci u vezi s učinkom suplementacije biotina na ove aspekte svojstava kopita ne mogu se izvesti, s obzirom na očigledne kontradiktorne nalaze prijavljene u ove dve studije.

Cilj ovog istraživanja jeste da se utvrdi uticaj suplementacije biotinom, u periodu od 60 dana, na opšte stanje kopita (ocenjeno subjektivnom ocenom istraživača) i čvrstoću tj. gustinu kopita konja(izmerenu adekvatnim instrumentom). Navodima proizvođača korišćenog suplementa, može se očekivati pozitivan uticaj na kvalitet kopita tretiranih konja. Rezultati će pružiti informacije o eventualnom doprinosu suplementacije biotinom na promenu kvaliteta kopita. Konačni cilj rada jeste da se nakon analize rezultata na inicijalnom i finalnom merenju, primenom adekvatnih statističkih metoda obrade podataka, izvedu zaključci o eventualnim promenama kvaliteta kopita konja, nakon delovanja definisanog tretmana.

MATERIJAL I METOD

Uzorak ispitanika predstavljalo je 27 konja iz konjičkog kluba ”Viking”, Čenej – Novi Sad. Pre započinjanja istraživanja pribavljena je saglasnost vlasnika konja i štale radi angažovanja njihovih grla i prostora u cilju njegove realizacije.

U tabeli 1. prikazane su osnovne karakteristike i obeležja, po kriterijumu pola, rase, starosne dobi i namene grla. U narednim kolonama iste tabele, prikazana je frekvencija pojavljivanja u okviru ukupnog uzorka i subuzoraka (eksperimentalna i kontrolna grupa). U okviru ukupnog uzorka, definisane su: eksperimentalna i kontrolna grupa, varijable za praćenje i ocenu, kao i tretman, s obzirom da je istraživanje bilo longitudinalnog tipa. Po kriterijumu pola, u okviru ukupnog uzorka, kobile su zastupljene sa 8, kastrati sa 15 (55,6%) i pastuvi sa 4 jedinke. Po kriterijumu rase, najzastupljenija je Holštajn sa 6 grla (37%), a ostale podjednako sa po jednim ili 2 grla (HF i Z po dva, a BWP, KWPN, WF i HUSH po 1). Po kriterijumu starosne dobi grla, ujednačena je frekvencija pojavljivanja (od 4 do 7, sa definisanim rasponima starosti od po 5 godina). Najmlađe grlo, u okviru ukupnog uzorka imalo je 4, a najstarije 24 godine. Po kriterijumu namene grla u okviru ukupnog uzorka, najveći broj pojavljivanja je bio kod grla namenjenih za takmičenje, 17 (63%). Mladih i onih koji su namenjeni priplodu bilo je po tri jedinke, a konja nemenjenih za školu jahanja, četiri. Za definisanje eksperimentalne i kontrolne grupe u okviru ukupnog uzorka konja u istraživanju, osnovni kriterijum je bila saglasnost vlasnika da se na njihova grla primeni tretman suplementacije biotinom u okviru ishrane. Tako je definisana eksperimentalna grupa od 14, i kontrolna grupa od 13 jedinki, sa karakteristikama i obeležjima prikazanim u gornjoj tabeli. Od 17 takmičarskih grla u ukupnom uzorku, tretmanom predviđenim u istraživanju, tretirana su samo četiri konja. Grla eksperimentalne grupe su tokom 60 dana, u okviru jednog obroka redovne ishrane, dobijala i biotin u definisanoj količini – prema uputima proizvođača od 5 miligrama na dan. Obezbeđena je dovoljna količina praška biotina kao i merica za pravilno doziranje prilikom hranjenja. Boksovi za smeštaj grla eksperimentalne grupe u istraživanju bili su posebno i jasno obeleženi, a kao pomoć licu koje inače

redovno hrani sva grla. Jedinke kontrolne grupe primale su redovan obrok bez dodatka biotina.

Tabela 1. Karakteristike i obeležja uzorka istraživanja (*Z - Zangeršajd (Zangersheide); H - Holštajn (Holsteiner); HF - Haflinger (Haflinger); BWP - belgijski toplokrvni (Belgian warmblood), WF - vestfalski (Westphalian), KWPN - holandski toplokrvni (Dutch Warmblood), HUSH - mađarski sportski (Hungarian Sport Horse)

Karakteristike i obeležja ispitanika			**Grupa**	**UKUPNO**	
			Eksperimentalna (E)	**Kontrolna (K)**	
Pol (A)	1	kobila	6	2	**8**
	2	kastrat	5	10	**15**
	3	pastuv	3	1	**4**
Rasa (B)*	1	Z	2	2	**4**
	2	H	6	4	**10**
	3	HF	2	0	**2**
	4	BWP	1	2	**3**
	5	WF	1	0	**1**
	6	KWPN	1	3	**4**

Tabela 1. Karakteristike i obeležja uzorka istraživanja (nastavak).

	7	HUSH	1	2	**3**
Starost (V)	1	Do 5 god.	4	3	**7**
	2	6 do 10 god.	1	3	**4**
	3	11 до 15 год.	2	3	**5**
	4	16 do 20 god.	2	4	**6**
	5	Više od 20 god.	5	0	**5**
Namena (G)	1	školski	4	0	**4**
	2	priplodni	3	0	**3**
	3	takmičarski	4	13	**17**
	4	mladi	3	0	**3**

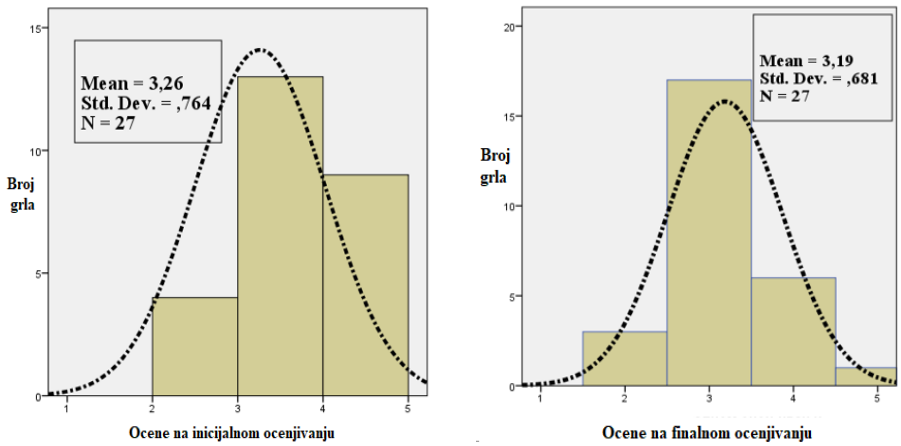
Dnevna količina hrane bila je podeljena u tri obroka. Ujutro i u podne dobijali su po 1/4 od ukupne količine hrane, a uveče 1/2. Dnevna količina formirana je u skladu sa kategorijom i kilažom, a obrok se sastojao od kabastog i koncentrovanog hraniva. Kabasto hranivo sačinjeno je od livadskog sušenog sena, dok se koncentrovano hranivo baziralo na ovsu, ječmu i kukuruzu. Dnevne potrebe za vodom namirene su takođe u skladu sa kategorijom i kilažom, a u proseku 25–50 l dnevno.

Kvalitet kopita jedinki obe grupe u ovom istraživanju, definisan je sa po dve varijable, pre i nakon delovanja tretmana: ocenom opšteg stanja kopita (OE1; OE2; OK1; OK2) i merom gustine – čvstoće kopita (GE1; GE2; GK1; GK2). Ocenjivanje opšteg stanja kopita vršeno je subjektivnom ocenom istraživača od 1 do 5, neposrednom inspekcijom, a na osnovu stavova nogu, opšteg izgleda i oblika kopita, kao i prisustva ili odsustva, oštećenja i njihovog stepena. Inspekcija je realizovana nakon izvođenja svakog grla pojedinačno iz boksa, slobodnim izborom redosleda od strane pomagača u merenju.

Gustina kopita merena je na tri pozicije na kopitu prednje leve noge (lateralnoj, medijalnoj i dorzalnoj u istoj ravni) durometrom DE-skale, a uz korišćenje njihove srednje vrednosti, za obradu. Viša vrednost očitana na instrumentu za merenje ukazuje na viši nivo gusitne – čvrstoće kopita. Ocenjivanje i merenje je vršio istraživač, na otvorenom prostoru uz dovoljno svetlosti i vremena za inspekciju, ocenjivanje i merenje. Istraživač nije imao neposredan uvid u pripadnost grla eksperimentalnoj ili kontrolnoj grupi. Evidentiranje ocena stanja kopita i vrednosti merenja gustine kopita, realizovano je nakon jasnog izveštavanja od strane istraživača.

Slika 1 i 2. Pregled i ocenjivanje opšteg stanja kopita.

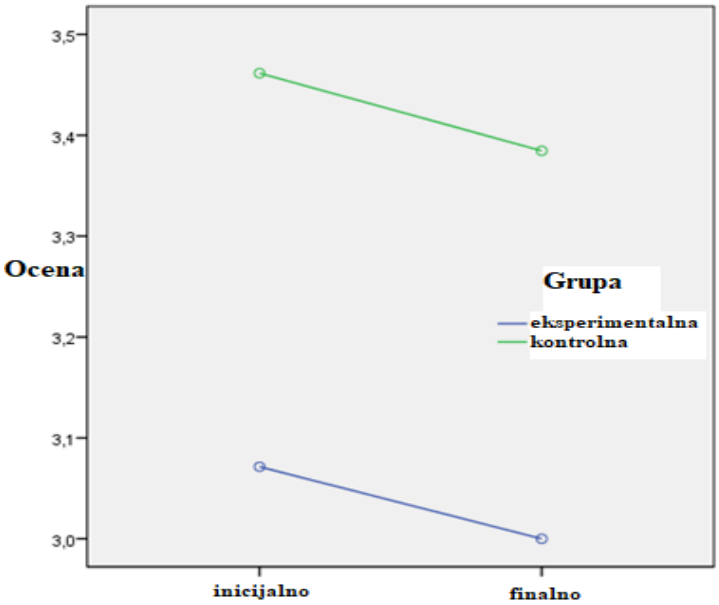
Slika 3 i 4. Merenje gustine - čvrstoće kopita durometrom DE-skale.



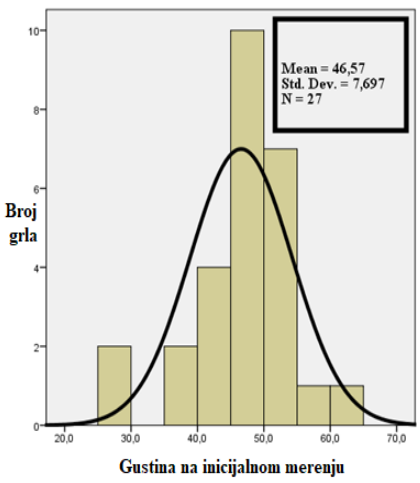
Grafikon 1. i 2. Ocene opšteg stanja kopita grla ukupnog uzoraka na inicijalnom i finalnom ocenjivanju.

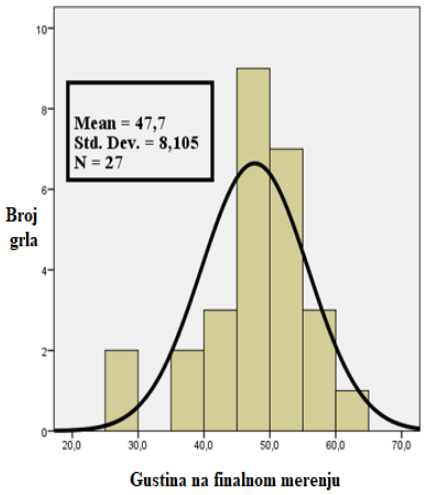
Tabela 2. Deskriptivni pokazatelji ocene opšteg stanja kopita.

Grupa	**Ocenjivanje**	**Br.**	**SV**	**SD**	**Min.**	**Maks.**	**Frekvencija ocena**				
							1	2	3	4	5
Eksperimentalna	Inicijalno	14	**3,07**	0,730	2	4	0	3	7	4	0
	Finalno		**3,00**	0,679	2	4	0	3	8	3	0
Kontrolna	Inicijalno	13	**3,46**	0,776	2	5	0	1	6	5	1
	Finalno		**3,38**	0,650	3	5	0	0	9	3	1



Grafikon 3. Prosečne ocene opšteg stanja kopita pre i nakon delovanja tretmana.

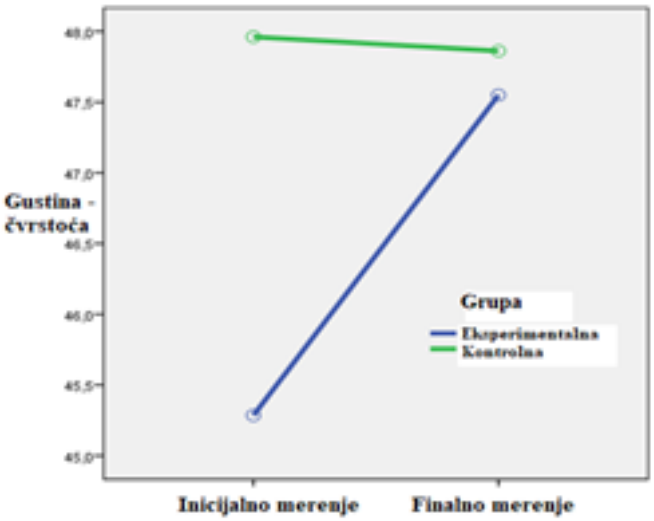




Grafikon 4. i 5. Gustina kopita grla ukupnog uzoraka na inicijalnom i finalnom merenju.

Tabela 3. Deskriptivni pokazatelji gustine kopita.

Grupa	Gustina	Br.	SV	SD	Min.	Maks.
Eksperimentalna	Inicijalno	14	**45,29**	9,5431	27,7	61,5
	Finalno		**47,55**	10,5479	26,7	60,8
Kontrolna	Inicijalno	13	**47,96**	5,0676	36,5	53,5
	Finalno		**47,86**	4,6629	37,8	55,7



Grafikon 6. Gustina kopita pre i nakon delovanja tretmana.

Tabela 4. Značajnost razlikovanja srednjih vrednosti između merenja.

TE - test	Razlika SV	St. dev.	St. greška SV	t	df	**Značajnost razlikovanja**
Eksperimentalna Gustina 1 – Gustina 2	-2,26	3,906	1,044	-2,17	13	**0,049**
Kontrolna Gustina 1 – Gustina 2	0,10	2,473	0,686	0,146	12	**0,886**

Tabela 5. Značajnost razlikovanja srednjih vrednosti između grupa na inicijalnom i finalnom merenju.

TE - test	Razlika SV	St. greška razlika	t	df	**Značajnost razlikovanja**
Inicijalno merenje Eksperimentalna – Kontrolna	-2,68	2,98	-0,89	25	**0,38**
Finalno merenje Eksperimentalna – Kontrolna	-0,31	3,18	-0,09	25	**0,92**

DISKUSIJA

Rezultati istraživanja prikazani su po redosledu navođenja za ukupni uzorak pre i nakon delovanja tretmana, a potom za eksperimentalnu i kontrolnu grupu za praćene varijable, opšteg stanja i gustine – čvrstoće kopita. Iz pokazatelja prikazanih grafikonima (Grafikon 1. i 2.), vidi se približno isti nivo prosečne vrednosti ocene opšteg stanja kopita (3,26; 3,19) kada se posmatra svih 27 grla u istraživanju, pre i nakon delovanja tretmana.

Prosečna vrednost ocene opšteg stanja kopita grla eksperimentalne grupe na ocenjivanju pre započinjanja delovanja tretmana (3,07) niža je od utvrđene vrednosti kod grla koja su činila kontrolnu grupu u istraživanju (3,46). Osim pribavljene saglasnosti vlasnika konja, za učešće u istraživanju, interes istraživanja je bio i potencijalni doprinos boljem opštem stanju kopita kod konja na koje je planirana primena tretmana biotinom, a nakon delovanja istog.

U frekvencijama pojavljivanja pojedinačnih ocena od 1 do 5, vidi se značajna zastupljenost ocene 3 (7 i 6), kod obe grupe u istraživanju, a na inicijalnom ocenjivanju, tj. pre delovanja tretmana (Tabela 2.).Opšte stanje kopita grla, oba uzorka u istraživanju, ocenjeno je najčešće prosečnom ocenom (3) uz primećenu razliku srednje vrednosti između grla eksperimentalne i kontrolne grupe.

Na ocenjivanju pre započinjanja tretmana, prosečna vrednost opšteg stanja kopita, grla eksperimantalne grupe bila je primetno niža (3,07) od iste kod grla kontrolne grupe (3,46). Prethodno ukazuje na prosečnost kvaliteta kopita konja obe grupe, (zdrava, nešto slabijeg elasticiteta, solidnih žabica ali i nedovoljno izbalansiranih uglova kopita).

Definisanje opšteg stanja kopita putem ocenjivanja inicijalno i na finalnom ocenjivanju pokazuje veoma slične vrednosti.

Prikazane prosečne vrednosti (3,00; 3,38) „zadržale“ su razlikovanje sa inicijalnog ocenjivanja (Grafikon 3.) Primetna je izražena frekvencija pojavljivanja prosečne ocene kod obe grupe u istraživanju (8 i 9 pojavljivanja). Prethodni rezultati doprinose učvršćivanju stava Gejera i Šulca (13) da je subjektivna ocena opšteg stanja kopita od strane ocenjivača nedovoljno kvalitetan – precizan alat. Ovo posebno u uslovima malih uzoraka u istraživanju, kratkom vremenu za delovanje tretmana kao i izostajanju angažovanja većeg broja ocenjivača, što je u korelaciji sa istraživačkim stavom Joseka i saradnika (14). Distribucija rezultata druge praćene varijable u istraživanju, gustine kopita konja, ukupnog uzorka, prikazana na grafikonima (Grafikon 4. i 5.) ukazuje na sličnost istih, pre i nakon delovanja tretmana. Poreklo sličnosti ili malih razlika može se tražiti u povećanju vrednosti gustine kopita konja eksperimentalne grupe nakon delovanja definisanog tretmana biotinom, što se dovodi u vezi sa istaživanjem Joseka i saradnika (14).

Analizom informacija o srednjim vrednostima gustine kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe u istraživanju (SV, Tabela 3.) pre i nakon delovanja definisanog tretmana, primećuje se niža vrednost gustine – čvrstoće kopita konja eksperimentalne grupe (45, 29) u odnosu na kontrolnu grupu (47, 96) na merenju pre početka delovanja tretmana. Prosečne vrednosti gustine kopita konja kontrolne grupe na finalnom merenju više su od prosečne vrednosti rezulta eksperimentalne grupe, ali ipak značajno bliže u odnosu na inicijalno merenje (47,55; 47,86).

Grafički prikaz (Grafikon 6.) ukazuje na razlikovanje grupa po osnovu prosečnih vrednosti gustine kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe na inicijalnom merenju kao i na značajno manje razlikovanje nakon delovanja primenjenog tretmana – finalnom merenju.

Na osnovu rezultata TE – testa za male zavisne uzorke (Tabela 4.) dobijene su informacije koliko puta je razlika dve srednje vrednosti veća od greške (21). Za analizu rezultata ovog istraživanja, izabrana je granična vrednost zaključivanja o značajnosti razlikovanja od pe = 0.05 (značajnost razlikovanja p=.05). Ovo znači da bi se npr. u 100 ponovljenih merenja u praćenoj varijabli, najviše u 5 merenja, pronašla razlika koja ne bi bila statistički značajna ($t \geq 1,96$). Iz vrednosti prikazanih u poslednjoj koloni gornje tabele (0,049) može se zaključiti statistički značajno razlikovanje izmerenih vrednosti gustine kopita konja eksperimentalne grupe, pre i nakon delovanja tretmana. Viši nivo prosečne vrednosti, nakon delovanja tretmana (47, 96) ukazuje na njegovo pozitivno delovanje na gustinu kopita konja eksperimentalne grupe, što je u skladu sa istraživanjem sprovedenom od strane Bufe i saradnika (10).

U isto vreme, prosečne vrednosti gustine kopita konja kontrolne grupe (Tabela 3.) na inicijalnom (47, 96) i finalnom merenju (47, 86), ukazujuna njihovo razlikovanje, ali ne i statistički značajno (Tabela 4.) o čemu govori dobijena vrednost TE - testai (0,886).

Prikazani rezultati TE – testa za male nezavisne uzorke (Tabela 5.) za gustinu kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe na inicijalnom (0,38) i finalnom merenju (0,92) ukazuju na nepostojanje statistički značajnog razlikovanja. U isto vreme, upoređenjem prosečnih vrednosti gustine kopita između grupa (Tabela 3.), na inicijalnom (45,29; 47,96), i merenju nakon delovanja definisanog tretmana biotinom (47,55; 47,86) primećuje se značajno manje razlikovanje kao posledica promene vrednosti finalnog merenja kod grla eksperimentalne grupe. Postojeće promene se mogu pripisati delovanju definisanog tretmana.

ZAKLJUČAK

Nakon realizovanog istraživanja na uzorku od 27 konja i delovanja suplementacije biotinom, količinom od 5 miligrama u trajanju od 60 dana kod 14 konja, moguće je doneti sledeće zaključke:

Opšte stanje kopita svih konja u istraživanju ocenjeno je prosečnom ocenom i definisano kao kopita koja su prosečnog kvaliteta - zdrava, suva, nešto slabijeg elasticiteta, solidnih ili blago oštećenih žabica ali i nedovoljno izbalansiranih uglova. Kod ocenjivanja opšteg stanja kopita subjektivnom ocenom, utvrđene su razlike između grla eksperimentalne i kontrolne grupe, a u korist kontrolne grupe. Isto stanje evidentirano je i nakon delovanja tretmana u istraživanju. Gustina tj. čvrstoća kopita konja eksperimentalne grupe (merena durometrom), pre delovanja tretmana biotinom, bila je na primetno nižem nivou od iste kod konja kontrolne grupe. Nakon delovanja tretmana, razlika srednjih vrednosti gustine između grupa je smanjena, a kao posledica povećanja iste kod konja eksperimentalne grupe, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima.

Analizom značajnosti razlikovanja gustine kopita konja eksperimentalne grupe, pre i nakon delovanja tretmana biotinom, utvrđeno je da je ista statistički značajna (pe =0,049), s obzirom na izabrani nivo za zaključivanje od pe=0,05. Nije utvrđena statistički značajna razlika između gustine kopita konja eksperimentalne i kontrolne grupe, na inicijalnom nivou (pe = 0,38) kao ni na finalnom nivou, nakon delovanja tretmana (pe = 0,92). Ukupno posmatrano, može se prihvatiti stav o pozitivnom doprinosu suplementacije biotinom na putu poboljšanja gustine - čvrstoće kopita tretiranih konja, svakako uz naznaku značaja vremena delovanja.

Opravdanost za opreznost pri donošenju zaključaka mogu nametati i činjenice o veličini uzoraka u ovom istraživanju, vremenu trajanja tretmana i kvalitetu korišćenog instrumenta za merenje. I pored svega, moguće je prihvatiti pozitivno delovanje biotina na gustinu kopita konja kod kratkoročne supementacije.

LITERATURA

1. *Budras K. D, Sack W, Röck S. Anatomy of the Horse. 6th edition. Hannover: Schültersche Verlagsgesellschaft mbH & Co; 2011.*

2. *Salo, Z., Runciman, R. J., & Thomason, J. J. A dynamic model of a horse hoof at first contact. Biosystems Engineering, 2009, 103(3), 364–373.*

3. *Pollitt C.C. The anatomy of the inner hoof wall: new information. Proceedings Annual Seminar of the Equine Branch of the NZVA. Veterinary Continuing Education. Massey University C Palmerston: 1994; 167: 97-106.*

4. *J. D. Reilly. Effects of dietary biotin on the physiology, anatomy and mechanics of pony hoof horn [PhD thesis]. University of Edinburgh; 1999.*

5. *Butler K.D. and Hintz H.F. Effect of level of feed intake and gelatin supplementation on growth and quality of hoofs of ponies. J. Anim. Sci. 1977; 44: 257-261.*

6. *Ralston, S. L. Evidence-Based Equine Nutrition. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 2007, 23(2), 365–384.*

7. *Manthe, B. N., & Youngs, C. R. An Overview of Vitamin Requirements of the Domestic Horse. Natural Sciences Education,2013, 42(1), 179.*

8. *Lipner, S. R. Rethinking biotin therapy for hair, nail, and skin disorders. Journal of the American Academy of Dermatology, 2018, 78(6), 1236–1238.*

9. *Whitehead C.C. Biotin in Animal Nutrition. Hoffmann-La Roche; Basel: 1998.*

10. *Buffa E.A, Van der Berg S.S, Verstraete F.J.M, Swart N.G.N. Effect of dietary biotin supplement on equine hoof horn growth rate and hardness. Equine Veterinary Journal. 1992; 24 (6): 472-474.*

11. *Zenker W, Josseck H, Geyer H. Histological and physical assessment of poor hoof horn quality in Lipizzaner horses and a therapeutic trial with biotin and a placebo. Equine Veterinary Journal. 1995; 27 (3): 183-191.*

12. *Josseck H, Zenker W, Geyer H. Hoof horn abnormalities in Lipizzaner horses and the effect of dietary biotin on macroscopic aspects of hoof horn quality. Equine Veterinary Journal. 1995; 27 (3); 175-182.*

13. *Geyer H, Schulze J. The long-term influence of biotin supplementation on hoof horn quality in horses. Schweizer Archiv für Tierheikunde. 1994; 136 (4): 137-149.*

14. *Josseck H, Zenker W, Geyer H. Hoof horn abnormalities in Lipizzaner horses and the effect of dietary biotin on macroscopic aspects of hoof horn quality. Equine Veterinary Journal. 1995; 27 (3); 175-182.*

15. *Милосављевић П, Кнежевић С. Обољење копита коња. Clinicaveterinaria. Зборник радова 6. међународног саветовања из клиничке патологије и терапије животиња. Будва: 2004; 420-422.*

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 2, No1, 2021
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 378.147
Galić et al., pp 21-25

TUMOR TESTISA PSA KAO POSLEDICA KRIPTORHIZMA - PRIKAZ SLUČAJA

TESTICULAR TUMOR IN DOG AS A CONSEQUENCE OF CRYPTORCHIDISM- A CASE REPORT

Ivan Galić[a*], Bojan Toholj[a], Ivan Stančić[a], Jovan Spasojević[a], Ivana Davidov[a], Tijana Kukurić[a], Sandra Nikolić[a], Nadežda Tešin[a], Nenad Popović[a]

[a]Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija
[a]University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia
**Autor za kontakt: ivangalicvet@gmail.com*

SAŽETAK

Kriptorhizam je jedna od najčešćih genitalnih mana kod pasa. Nastaje kao posledica neuspešnog spuštanja jednog ili oba testisa u skrotum. U ovom prikazu slučaja opisana je orhidektomija abdominalnog desnog testisa i skrotalnog levog testis psa. Ovaj slučaj upućuje na to da jednostrani kriptorhizam uzrokuje morfološke defekte testisa. Osim toga, jednostrani kriptorhizam povećava proliferativnu aktivnost Sertolijevih ćelija, što može biti predisponirajući faktor za karcinom testisa kriptorhida. Uopšteno, kriptorhizam je bolest koja često može biti komplikovana drugim oboljenjima, a kao najčešći se mogu izdvojiti različiti oblici neoplazija.

Ključne reči: pas, kriptorhizam, testis, tumor

ABSTRACT

Cryptorchidism is one of the most common genital defects in dogs. It is caused by the failure of the scrotum of one or both testes to descent. In this case report described orchidectomy was performed on the abdominal left testis and the scrotal right testis in dog. This result suggest that unilateral cryptorchidism causes morphological defects of testis. In addition, unilateral cryptorchidism increases proliferative activity of Sertoli cells, which may be a predisposing factor for cancer in cryptorchid testes. Overall, cryptorchidism is a disease that can often be complicated with other diseases, the most common they can be singled out various forms of neoplasia.

Key words: dog, cryptorchidism, testis, cancer.

PRIKAZ SLUČAJA

Pas je doveden u fakultetsku veterinarsku kliniku, Departmana za veterinarsku medicine, radi pregleda i mogućih terapijskih protokola zbog problema zaostalog desnog testisa. Pas je bio starosti deset godina, rase ši-cu, muškog pola, težine 6,2kg. Trijas je bio uredan, temperatura 38,1°C, puls 120/min., respiracija 32/min., dlačni pokrivač bez osobenosti, palpatorni limfni čvorovi nisu odstupali u veličini. Srčani ritam pravilan, auskultacijom pluća nisu ustanovljeni šumovi. Adspekcijom je uočena promena u predelu ingvinalnog kanala sa desne strane, palpatorno tvrda, a ultrazvučnim pregledom potvrđeno je da se radi o patološki promenjenom tkivu testisa. Levi testis se nalazio u svom anatomskom položaju u skrotumu. Pacijentu je uzorkovana krv za hematološki i biohemijski pregled, koji je odrađen u fakultetskoj laboratoriji za patološku fiziologiju. Hematološki i biohemijski parametri bili su u fiziološkim granicama i pacijentu je zakazana hirurška intervencija orhidektomija oba testisa.

Hirurški zahvat kod pacijenta izveden je u opštoj inhalacionoj anesteziji, po svim načelima dobre veterinarske i hirurške prakse. Prvo je izvedena premedikacija opšte anestezije, koja je podrazumevala intravensku aplikaciju sedativa. Sedacija je izvedena pomoću ksilazina (Xylased, Bioveta, Češka Republika) u dozi 1mg/kg telesne mase. Nakon izvođenja postupka premedikacije, pristupljeno je pripremi operacionog polja. Dlačni pokrivač je uklonjen sa abdomena, prepucijuma i skrotuma. Koža je prvo oprana neutralnim sapunom, a zatim je izvršena dezinfekcija kože pomoću 70% rastvora etil alkohola i 10% rastvorom povidon joda.

Indukcija opšte inhalacione anestezije izvršena je intravenskom aplikacijom ketamina (Ketamidor 10%, Richter pharma ag, Austrija) u dozi 3mg/kg telesne mase. Održavanje opšte anestezije izvršeno je pomoću sevoflurana (Sevorane 100%, Aesica Queenborough Limited, Velika Britanija) sa minimalnom alveolarnom koncentracijom od 2,3%. Zbog slučaja unilateralnog abdominalnog kriptorhizma rez je plasiran paramedijalno u odnosu na belu liniju. Nakon inicijalnog reza kroz kožu izvršeno je preparisanje potkožja i plasiranje incizije kroz mišić kako bi se pristupilo trbušnoj duplji i vizuelizaciji suspektnog testisa (Slika 1.). Nakon vizuelizacije suspektnog testisa izvršeno je podvezivanje spermatičnog snopa (*Funiculus spermaticus*). U ovom slučaju urađena je tehnika orhidektomije sa zatvorenom *tunicom vaginalis*, kako ne bi došlo do kontaminacije okolnog tkiva sa neoplastičnim ćelijama.

Makroskopskim pregledom promenjenog testisa utvrđeno je da je veći deo testisa zahvaćen neoplastičnim promenama, jasno ograničen, inkapsuliran, nepravilno-ovalnog oblika, veličine 4,0 x 2,7 cm, sive do žute boje, čvrste konzistencije. Promenjeni testis je bio tri puta veći u odnosu na testis bez promena, koji se nalazio u skrotumu. Za podvezivanje spermatičnog snopa korišćen je resorptivni multifilamentni konac PGA, USP 2/0 (Yavo, Poljska). Nakon dvostrukog podvezivanja izvršeno je odstranjivanje zaostalog testisa. Zatvaranje trbušnog zida izvršeno je resorptivnim multifilamentnim koncem PGA, USP 2/0 (Yavo, Poljska), tekućim šavom. Nakon zatvaranja trbušnog zida izvršeno je šivenje potkožnog vezivnog tkiva istim koncem. Šivenje kože izvršeno je neresorptivnim monofilamentnim koncem NYLON, USP 2/0 (Yavo, Poljska) pojedinačnim čvorastim šavom. Testis koji se nalazio u skrotumu uklonjen je preskrotalnom hirurškom metodom orhidektomije (Slika 2.).

Slika 1. Vizuelizacija suspektnog zaostalog testisa

Slika 2. Morfološki nepromenjen (gore) i zaostali promenjeni testis (dole)

Nakon odstranjivanja oba testisa, suspektni zaostali testis fiksiran je 48h u 10% neutralnom formalinu i poslat na patohistološku analizu, koja je izvršena u fakultetskoj laboratoriji za patologiju. Nakon fiksacije, izvršeno je modeliranje tkiva i uklapanje tkiva u parafin. Tkivni isečci su sečeni na mikrotomu, debljine 5µm, bojeni hematoksilinom i eozinom, a potom analizirani mikroskopski na uveličanju 100x. Na histološkom preparatu uočene su tumorske ćelije, ovalnog oblika u vidu lobusa koje prolaze kroz bazalnu membranu u intersticijum. Tumorske ćelije imale su oskudnu citoplazmu, sa krupnim i okruglim jedrima, bez mitotskih figura. Na osnovu patohistološkog preparata postavljena je dijagnoza *Seminoma benignum canis* (Slika 3.).

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU
Trg Dositeja Obradovića 8
21000 Novi Sad

Ustanova koja je poslala uzorak:	Veterinarska klinika	
Broj zdravstvenog kartona-protokola	7280	11/21PK
Ime i prezime vlasnika životinje: Nela Markov		
Vrsta životinje:	Pas	
Rasa životinje:	Ši-cu	
Starost životinje:	10 godina	
Pol životinje:	m	
Uzorak koji je poslat:	Testis	
Datum uzimanja uzorka:	29.06.2021.	

PATOLOŠKO-HISTOLOŠKI NALAZ:

Datum prijema: 30.06.2021.

Tip uzorka: Uzorak (1 kom.) testisa veličine 4,0 x 2,7 cm.

Na histološkom preparatu testisa psa se uočavaju okrugle ćelije sa velikim ovalnim jedrom i sa odsustvom bojenja citoplazme eozinom.

Dg. Seminoma benignum canis

Slika 3. Patohistološki nalaz

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Kriptorhizam kod pasa, kao i kod drugih životinjskih vrsta, predstavlja zaostajanje testisa sa pripadajućim anatomskim strukturama unutar abdomena ili ingvinalnog kanala, odnosno izostanak spuštanja ovih struktura u skrotum. Na osnovu toga da li jedan ili oba testisa zaostaju, kriptorhizam se deli na unilateralni i bilateralni, dok se na osnovu lokalizacije testisa, kriptorhizam može podeliti na abdominalni, ingvinalni i potkožni kriptorhizam. Unilateralni kriptorhidi mogu proizvoditi spermu, dok su bilateralni sterilni. Kriptorhizam je jedno od najčešćih oboljenja muškog reproduktivnog trakta, sa stopom incidencije između 0,8-9,7% (1). Psi sa dijagnozom kriptorhizma imaju veći rizik od neoplazije testisa (2). Najčešće se javljaju tumori intersticijuma, odnosno Leydigovih ćelija, tumori germinativnog epitela testisa-seminomi i tumori Sertolijevih ćelija. Tumor Sertolijevih ćelija je čest kod pasa, posebno kod pasa sa dijagnozom kriptorhizma, ali je zabeležen i kod bikova, ovnova, pastuva i mačora (3). Veća incidencija seminoma tumora može se pripisati činjenici da ovi tipovi tumora rezultiraju jasnijim kliničkim znakovima, odnosno povećanjem testisa (4,5). Ovakav nalaz utvrđen je i u našem slučaju, što se jasno uočava nakon orhidektomije oba testisa. Lalošević i sar. (6) od trinaest dijagnostikovanih tumora testisa pasa, detektuju dva seminoma. Kod jednog je, kao i u našem slučaju, utvrđen unilateralnom kriptorhid. Takođe, istraživanje koje su sproveli Liao i sar. (7) ukazuje da je tumorom zahvaćen češće desni testis, zbog toga što on i češće zaostaje u abdomenu, odnosno ingvinalnom kanalu, kako je bilo i u ovom slučaju. U analizi koju prikazuju Marinković i sar. (5) tumor seminom se najranije javio u devetoj godini, a najkasnije u petnaestoj godini, sa prosečnim uzrastom pasa od 10,8 godina, što se poklapa sa našim nalazom, gde je pas bio starosti deset godina. Istraživanje koje nam govori o incidenciji tumora kod pasa, obavljeno je na 232 pasa koja nisu pokazivala nikakve simptome tumora testisa (4).

Ovo istraživanje je obuhvatalo mužjake svih rasa, različite starosti, a uzeta su oba testisa za patohistološku analizu. Utvrđeno je da je 27% pasa imalo tumor testisa, od kojih je 50% imalo tumor Leydigovih ćelija, 42% seminom, a svega 8% tumor Sertolijevih ćelija. Takođe, 31% od ukupnog broja obolelih imao je kombinacije ovih tumora. Zajedno su se najčešće pojavljivali tumori Laydigovih ćelija i seminom, potom tumor Leydigovih i tumor Sertolijevih ćelija, dok je kombinacija seminoma i tumora Sertolijevih ćelija zabeležena u malom broju slučajeva. Slično ovim rezultatima, studija koju su izveli Gazin i sar. (8), uključila je analizu 358 pasa, sa 447 tumora testisa u periodu od jedanaest godina. Najčešće detektovani tumori su bili tumori Laydigovih ćelija (50,8%). Nasuprot tome, u 23,9% slučajeva prijavljuju seminom tumor, u 17,9% slučajeva tumor Sertolijevih ćelija i 7,4% mešovitih tumora germinativnih ćelija. Analizom prikazuju da se 26 (7,6%) tumora testisa razvilo iz testisa kriptorhida, uključujući 16 (61,5%) tumora Sertolijevih ćelija, 10 (38,5%) seminoma, i bez tumora Laydigovih ćelija.

Orhidektomija je preporučena metoda odstranjivanja testisa koji je zahvaćen tumorom, ali postoji mogućnost i metastaziranja tumora pa je hemioterapija takođe jedan od mogućih terapijskih protokola (9,10). Iako su metastaze retka pojava, mogu se pojaviti, a prognoza zavisi o veličini i lokalizaciji metastaza.

Kriptorhizam pasa predstavlja predisponirajući faktor za nastanak tumora testisa kod pasa. Važna stavka kliničkog pregleda je i pregled genitalnog trakta mužjaka pasa i rano otkrivanje pacijenata sa dijagnozom kriptorhizma. Tumori testisa kod pasa javljaju se u manjem procentu u kliničkoj praksi. Zbog mogućih različitih manifestacija, mogućih metastaza, potrebna je pravovremena dijagnostika i hirurška intervencija odstranjivanja istih. Patohistološka analiza promenjenih testisa je sigurna metoda za predviđanje daljeg ishoda bolesti.

LITERATURA

1. *Moon J. H., Yoo D.Y., Jo Y.K., Kim G.A., Jung H.Y., Choi J.H., Hwang I.K., Jang, G. Unilateral cryptorchidism induces morphological changes of testes and hyperplasia of Sertoli cells in a dog. Laboratory Animal Research 2014, 30(4): 185-189.*
2. *Sousa A.O., de Sousa D.C., da Silva Filho M.L., Gonçalves L.M.F., Neto J.P.C., Dantas J.B.G., Magalhães N.A., Ribeiro L.N. Cryptorchidism as a pathology associated with testicular neoplasia: case report. Journal of Multidisciplinary Sciences 2022, 4: e2022011*
3. *Agnew D.W. Tumors of the genital systems. In: Meuten, DJ, ed. Tumors in Domestic Animals. 5th ed. Ames, IA: Wiley, 2017, 689-722.*
4. *Grieco V., Riccardi E., Greppi G.F., Teruzzi F., Iermano V., Finazzi M. Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. Journal of Comparative Pathology 2008, 138: 86-89.*
5. *Marinković D., Pavlović N., Magaš V., Aleksić-Kovačević S. Patohistološka studija tumora testis i jajnika pasa u period od 1999. do 2003. godine. Veterinarski glasnik 2006, 60 (1-2): 51-60.*
6. *Lalošević D., Prašović S., Kovačević S., Putić S., Vasić I. Patološka dijagnostika tumora genitalnog trakta pasa. Letopis naučnih radova 2008, 32 (1): 133-139.*
7. *Liao A.T., Chu P.Y., Yeh L.S., Lin C.T., Liu C.H. A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. Journal of Veterinary Medical Science 2009, 71(7): 919-923.*
8. *Gazin A.A., Vatnikov Y.A., Sturov N.V., Kulikov E.V., Grishin V., Krotova E.A., Razumova A.A., Rodionova N.Y., Troshina N.I., Byakhova V.M., Lisitskaya, K.V. Canine testicular tumors: An 11-year retrospective study of 358 cases in Moscow Region, Russia. Veterinary World 2022, 15: 483-487.*
9. *Brearley MJ. The urogenital system. In: White RAS, editor. Manual of Small Animal Oncology. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association 1991, 306-307.*
10. *de Andrade A.B.P., Vasconcelos J.G., Colares J.C., de Magalhães F.F. Testicular seminoma in a dog and its clinical, ultrasonographic, cytological and histopathological aspects: case report. Brazilian Journal of Case Reports 2021, 1(3): 66-73.*

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 2, No1, 2021
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 636.09
Petrović et al., pp 26-32

UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA VREDNOSTI TNF-α, HAPTOGLOBINA I FIBRINOGENA KOD KRAVA U PERIPARTALNOM PERIODU

PATNOANATOMICAL CHANGES OF LUNGS IN CALVES WITH PNEUMONIA

Kosta Petrović[a]*, Filip Štrbac[b], Dragica Stojanović[b]

[a]Poljoprivredna škola sa domom učenika u Futogu, Carice Milice 2, Novi Sad, Srbija
[b]Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
[a]Agricultural school with dormitory in Futog, Carice Milice 2, Novi Sad, Serbia
[b]University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia
**Autor za kontakt: kostapetrovic84@gmail.com*

SAŽETAK

Peripartalni period kod krava predstavlja stanje metaboličkog stresa koje se karakteriše različitim negativnim efektima. U ovom radu su opisani inflamatorni procesi kod krava u peripartalnom periodu. Naime, opisano je delovanje citokina, kao i interakcija citokina, metabolita i jetre kao centralnog metaboličkog organa. Prikazana je inflamacija tkiva u peripartalnom periodu sa posebnim osvrtom na značaj faktora nekroze tumora alfa (TNF-α). U tom kontekstu, ispitan je uticaj aplikacije niacina kod krava na regulisanje inflamatornog odgovora kroz merenje vrednosti TNF-α, haptoglobina i fibrinogena i poređenje sa kontrolnom grupom. Smanjenje koncentracije TNF-α i haptoglobina pod uticajem niacina ukazuje na njegov antiinflamatorni efekat, što sugeriše na značaj njegove primene kod krava u peripartalnom periodu.

Ključne reči: krave, inflamacija, niacin, TNF-α

ABSTRACT

The peripartum period in cows represents a state of metabolic stress characterized by various negative effects. This paper describes the inflammatory processes in cows during the peripartum period. Namely, it describes the action of cytokines, as well as the interactions of cytokines, metabolites and the liver as the central metabolic organ. Tissue inflammation in the peripartum period is presented with a particular focus on the importance of tumor necrosis factor alpha (TNF-α). Within this context, the influence of niacin application in cows on the regulation of the inflammatory response was examined by measuring the values of the TNF-α, haptoglobin and fibrinogen and comparing it with the control group. The decrease in the concentration of TNF-α and haptoglobin under the influence of niacin indicates its anti-inflammatory effects, which suggests the importance of its use in cows in the peripartum period.

Key words: cows, inflammation, niacin, TNF-α

UVOD

Najčešći zapaljenski procesi koji mogu nastati u periodu rane laktacije su metritis koga uzrokuje zadržavanje posteljice i mastitis. Bilo koji od navedenih procesa, a neretko i oba dodatno ozbiljno komplikuju i otežavaju već opterećene metaboličke procese homeorezom u puerperijumu. Štetni efekat zapaljenski procesi ispoljavaju stimulacijom simpatikusa kojom se pokreće lipoliza, pri čemu je ujedno izazivaju i odsustvo apetita i smanjen unos hrane (1). Zapaljenski procesi su uvek praćeni oslobađanjem proinflamatornih citokina (TNF-α, interleukin 1 i 6) iz leukocita. Citokini stimulišu aktivnost imunološkog sistema, podižu telesnu temperaturu, pri čemu troše visok procenat energije (2). Inflamatorni procesi nepovoljno utiču i na dejstvo insulina remeteći njegov metabolički zadatak stimulacije ulaska glukoze u ćeliju, što je posebno uočljivo kod krava sa masnom jetrom.

Niacin ispoljava antilipolitički efekat i dovodi do smanjenja lipolize i insulinske rezistencije u ranoj laktaciji i utiče pozitivno na funkcionalni status jetre (3).

Ono što je do sada malo poznato jeste da li niacin pored antilipolitičkog dejstva može imati i antiinflamatorno dejstvo i kako se odražava na stanje upale celog organizma. Cilj ovog rada je bio utvrditi uticaj niacina na inflamatorni odgovor kroz analizu i praćenje medijatora upale, pri čemu su u ovom radu ispitani faktor nekroze tumora alfa (TNF-α), haptoglobin i fibrinogen.

MATERIJAL I METODE

Ogled je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, bez znakova poremećaja zdravlja, uz proizvodnju mleka oko 7500 litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali se u tranzicionom periodu bile u porodilišu, gde je postojao vezani sistem. Ishrana krava je obročna, dok je u porodilištu posle partusa bila po volji. 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). 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.

Određivanje koncentracije TNF-α je vršeno pomoću hemilumiscentne imunotest ELISA metode. Koncentracija fibrinogena je određivana pomoću sendvič ELISA metode, pri čemu je mikrotitarska ploča prethodno obložena sa antitelom specifičnim za fibrinogen. Slično kao u slučaju fibrinogena, određivanje koncentracije haptoglobina je vršeno pomoću sendvič ELISA metode, a mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za haptoglobin.

REZULTATI

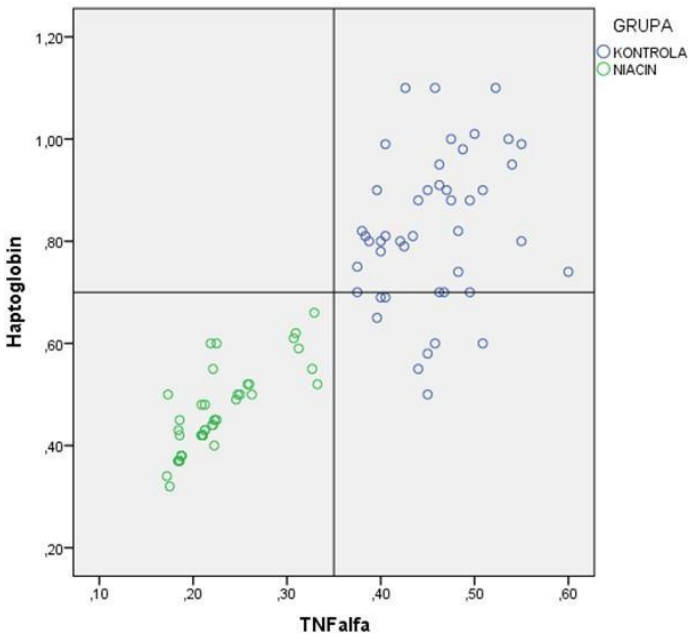
Iz rezultata prikazanih u tabeli se jasno uočava značajan uticaj niacina na vrednosti TNF- α i haptoglobina, dok se uticaj na vrednost fibrinogena nije ispoljio. Na osnovu analize rezultata iz tabele, potrebno je bilo utvrditi da li kombinovani uticaj aplikacije niacina i izmerene koncentracije TNF-α kod krava utiče na vrednosti inflamatornih parametara u krvi krava, te je utvrđen značajan uticaj na vrednost haptoglobina.

Tabela 1. Uticaj aplikacije niacina na vrednost inflamatornih pokazatelja TNF-α, haptoglobina i fibrinogena

GRUPA	**KONTROLA**			**NIACIN**			
Zavisna varijabla	N	Srednja vrednost	Std. devijacija	N	Srednja vrednost	Std. devijacija	Značajnost t-test
TNF-α (pg/mL)	45	0,4554	0,05391	45	0,2241	0,04472	<0,01
Haptoglobin(ng/mL)	45	0,8233	0,14843	45	0,4602	0,08209	<0,01
Fibrinogen(ng/mL)	45	0,9397	0,10900	45	0,9193	0,12349	NS

U analizi dijagrama rasturanja jasno se uočava razdvajanje krava (zeleno su označene krave koje su primale niacin) u odnosu na kontrolnu grupu krava (označeno plavim). Između haptoglobina i TNF-α postoji pozitivna korelacija.

Analizom dijagrama rasturanja jasno se vidi da postoji utvrđeni smer regresije, a pored navedenog vidi se jasna podela između vrednosti ispitivanih parametara u oglednoj i kontrolnoj grupi, što govori u prilog značajnosti upotrebe niacina kao antiinflamatornog medijatora.



Grafik 1. Dijagram rasturanja Haptoglobin/ TNF-alfa

DISKUSIJA

Citokini u jetri izazivaju stvaranje pozitivnih proteina akutne faze (+AP), haptoglobina, serumamiloida-A i ceruloplazmina, a smanjuju sintezu negativnih protein akutne faze (-AP), odnosno albumina, transferina, apolipoproteina i retinol-vezujućeg proteina (4). Pomenuti proteini su poznatiji kao proteini akutne faze, a radi se o akutnofaznoj reakciji koja ima ulogu zaštite domaćina. U bilo kom proizvodnom periodu krave su izložene brojnim agensima, a da bi sve štetne nokse bile pod kontrolom, imunološki sistem mlečnih krava je veoma aktivan, posebno u periodu puerperijuma tj. pred teljenje i na početku laktacije. Imunološki sistem se sastoji od urođenog i stečenog imuniteta, a ćelije koje sačinjavaju urođeni imunitet su: leukociti, citokini, eikosandini. Upravo su ove ćelije odgovorne za zaštitu organizma od samog rođenja (5). Već je istaknuto da akutni inflamatorni odgovor direktno pokreće metritis i mastitis, što se ubrzo odrazi na metabolizam, najpre masti i glukoze. Naime, akutni inflamatorni odgovor dovodi do povećanja nivoa glukoze, prilikom čega ovo povećanje traje kratko i zatim nastaje hipoglikemija (6). Posledica pojačane lipolize i razgradnje masnog tkiva je povećanje koncentracije NEFA u krvnoj plazmi. Visok nivo NEFA kod akutnog inflamatornog odgovora može da pokrene inflamatorni put nuklearnog faktora-kB (NF-kB) i ciklooksigenazne puteve, te se tako oslobađaju proinflamatorni citokini. Kako se u podacima iz literature navodi, inflamatorni put NF-kB je neki vid spone između inflamacije i metaboličkih bolesti (7). Prema navodima drugih autora (8), NF-kB inflamatorni put je direktno uključen i igra važnu ulogu u nastanku insulinske rezistencije. Sa drugog aspekta, NEFA i TNF-α aktiviraju kinazu koja dalje fosforiliše inhibitorni protein KB-b (IKK-β), pri čemu ove promene dovode do izostanka aktivacije protein kinaze B i utiču na povećanje prisustva transportnog molekula za glukozu (GLUT-4). Time se povećva osetljivost na insulin i samim tim smanjuje insulinska rezistencija (9). Haptoglobin putem formiranja kompleksa sa hemoglobinom ispoljava bakteriološki efekat, jer sprečava gubitak gvožđa i direktan je pokazatelj akutne inflamacije, pošto mu se tokom infekcije povećava koncentracija (10). U ovom istraživanju je pokazan uticaj niacina na TNF-α i haptoglobin, s obzirom da je niacin doveo do značajnog smanjenja vrednosti ovih važnih medijatora inflamacije. Dokazano je da koncentracija haptoglobina uvek raste u serumu krava sa mastitisom različite etiologije, te tako haptoglobin može biti jedan od pokazatelja zapaljenske reakcije (11). Fokus interesovanja velikog broja istraživača poslednjih godina upravo je istraživanje proteina akutne faze kroz ceo peripartalni period. Saznanje o uticaju haptoglobina na inflamaciju je poznato još sa kraja dvadesetog veka, a ustanovljeno je da se povećanje koncentracije haptoglobina dešava pre, za vreme i posle teljenja, prilikom čega može da potraje i do dva meseca od partusa kod krava sa inflamatornim procesima.

Haptoglobin i fibrinogen predstavljaju pozitivne proteine akutne faze. Pored poznate uloge fibrinogena u procesu zgrušavanja krvi, dokazano je i njegovo učestvovanje u regulaciji zapaljenskog procesa (12). U procesu hemostaze, fibrinogen indukuje intracelularnu mobilizaciju kalcijuma, utiče na fosforilaciju, aktivira NF-Kb, adheziju i migraciju (13). Već dugi niz godina fibrinogen se kod krava koristi za dokazivanje upalnih procesa kod pneumonija, mastitisa, metritisa, perikarditisa, endokarditisa, peritonitisa i nefritisa (14). Za razliku od TNF-α i haptoglobina (čije vrednosti su dvostruko smanjene), vrednost fibrinogena se nije značajno menjala.

Osim fibrinogena, i citokini su odgovorni za zapaljenske promene i samu aktivaciju imunog sistema. Kod svih infekcija

nezavisno da li je reč o bakterijskoj, virusnoj, parazitskoj ili gljivičnoj etiologiji, podiže se koncentracija svih citokina, između ostalih i TNF-α. Prema istraživanjima više autora, zabeležene su primetno više koncentracije TNF-α kod krava sa upalnim procesima, posebno kod onih kod kojih je eksperimentalno izazvana pleuropneumonija (15). TNF-α beleži više vrednosti čak i kod krava sa mastitisom, čiji je uzročnik *E.colli*. U ovom radu je zabeležen porast vrednosti TNF-α u peripartalnom periodu, a isto tako je pokazan i uticaj niacina na smanjenje vrednosti ovog važnog medijatora upale. Prema podacima iz literature, pored TNF-α i IFN-γ takođe izaziva aktivaciju makrofaga (16) i beleži više vrednosti kod upalnih procesa multipne etiologije.

Pored pomenutih TNF-α i IFN-γ citokina, beleži se povećanje i IL-1β i IL-6 neposredno pred teljenje, prilikom čega se vrednosti ovih citokina već nedelju dana nakon teljenja vraćaju u fiziološke. U nekim ispitivanjima utvrđeno je da jači proinflamatorni odgovor na bakterijsku infekciju nastaje baš u prvoj nedelji posle teljenja, kada su vrednosti opisanih citokina visoke (17). Proinflamatorni citokini sa povećanjem koncentracije dovode do niza poremećaja, pa se tako često mogu dovesti u vezu i sa plodnosti kod krava. Naime, kod krava koje su bile neplodne, izmerena je viša koncentracija IL-1 (IL-1α i IL-1β). Pomenuti citokini se zatim dalje dovode u vezu sa metaboličkim poremećajem i prestrojavanjem u ranoj laktaciji, te nastankom pojačane lipidne mobilizacije i ketogeneze (5).

Sasvim je izvesno da period rane laktacije karakteriše smanjenje koncentracije albumina, hemoglobina i holesterola i pored povećanog nivoa proinflamatornih citokina i proteina akutne faze (18). Ako se zna da se albumini stvaraju u jetri, a jetra je u peripartalnom periodu maksimalno opterećena, nameće se zaključak da je snižena albuminemija u direktnoj korelaciji sa opterećenom funkcijom jetre (6). Dakle, produkcija albumina je smanjena za vreme trajanja inflamatornih i infektivnih oboljenja, a kada je reč o međusobnom uticaju inflamatornih i metaboličkih poremećaja, dokazano je da povećana koncentracija NEFA u plazmi može uticati na smanjenje efikasnosti limfocita (19). Povećana koncentracija NEFA u cirkulaciji kod mlečnih krava može indirektno izazvati zapaljenje i uticati na intezitet i trajanje zapaljenja, jer NEFA se koriste kao prekursori inflamatornih eikosandina, poznatih medijatora zapaljenja.

Kod krava sa masnom jetrom je primećena korelacija koja se dovodi u vezu sa međusobnim uticajem između masne infiltracije i povećanjem koncentracije indikatora zapaljenja, najpre haptoglobina i serumamiloida A (18). TNF-α takođe prati ovaj patofiziološki proces i dovodi se u vezu sa masnom jetrom, s obzirom da mu se povećava aktivnost. Međusobni odnos između indikatora zapaljenja i masne jetre može biti obostran, što je i pokazano kada je vršena parenteralna primena TNF-α u trajanju od 7 dana, kod krava. Efekat je bio u vidu dvostruko veće koncentracije triglicerida, dok je sa druge strane pokazano da inflamatorne promene dovode do metaboličkih poremećaja. Najvažniju ulogu u izazivanju inflamatornog odgovora imaju oksidativni stres i lipidi. Dokazano je da ubrzani procesi lipidne peroksidacije mogu dovesti do nastanka oksidativnog stresa sa posledicom opadanja funkcije inflamatornog i imunološkog odgovora (20).

ZAKLJUČAK

Aplikacija niacina značajno utiče na vrednost TNF-α i haptoglobina tako što dovodi do opadanja vrednosti ovih medijatora upale. Sa druge strane, aplikacija niacina nije imala statistički značajan uticaj na vrednost fibrinogena kao pokazatelja inflamacije. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju na pozitivan efekat primene niacina na metaboličku adaptaciju krava u ranoj laktaciji u kontekstu njegovog antiinflamatornog dejstva.

ZAHVALNOST

Rad je rezultat projekta "Značaj određivanja i klinička evaluacija serumskog faktora nekroze tumora (TNF-α) u proceni inflamatornog odgovora preživara i pasa", Pokrajinski sekretarijat za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost Novi Sad.

LITERATURA

1. *Urton G., von Keyserlingk M.A.G., Weary D.M. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. Journal of Dairy Science 2005, 88(8):2843-2849.*
2. *Johnson R.W., Finck B.N. Tumor necrosis factor-α and leptin: two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. Journal of Animal Science 2001, 79 (suppl_E):E118–E127.*
3. *Petrović K., Stojanović D. Uticaj anti-inflamatornog efekta niacina na enzime jetre i oksidativni stres krava u ranoj laktaciji. Veterinarski Pregled 2020, 1(1):105-111.*
4. *Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. Journal of Dairy Science 2008, 91(9):3300-3310.*
5. *Sordillo L.M., Contreras G.A., Aitken S.L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. Animal Health Research Reviews 2009, 10(1):53-63.*
6. *Kushibiki S., Hodate K., Ueda Y., Shingu H., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. Journal of Animal Science 2000, 78(8):2164-2171.*
7. *Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metabolism 2011, 13(1):11-22.*
8. *Arkan M.C., Hevener A.L., Greten F.R., Maeda S., Li Z., Long J.M., Wynshaw-Boris A., Poli G., Olefsky J., Karin M. IKK-β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nature Medicine 2005, 11(2):191-198.*
9. *Shulman G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation 2000, 106(2):171-176.*
10. *Burtis C.A., Ashwood E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Saunders Company, London, 1999.*
11. *Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H., Kawamura S. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. Journal of Veterinary Medical Science 2001, 63(9):1021-1025.*
12. *McSherry B.J. Horney F.D., deGroot J.J. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. Canadian Journal of Comparative Medicine 1970, 34(3): 191-197.*

13. Flick M.J., Du X., Degen J.L. Fibrinogen-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo. Experimental Biology and Medicine 2004, 229(11):1105- 1110.
14. Hirvonen J., Pyörälä S., Jousimies-Somer H. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. Journal of Dairy Research 1996, 63(3):351-360.
15. Sacchini F., Luciani M., Salini R., Scacchia M., Pini A., Lelli R., Naessens J., Poole J., Jores J. Plasma levels of TNF-α, IFN-γ, IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia. BMC Veterinary Research 2012, 8:44.
16. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Leukocyte Biology 2004, 75(2):163-189.
17. Herath S., Lilly S.T., Santos N.R., Gilbert R.O., Goetze L., Bryant C.E., White J.O., Cronin J. and Sheldon I.M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. Reproductive Biology and Endocrinology 2009, 7(55):1-13.
18. Ametaj B.N., Bradford B.J., Bobe G., Nafikov R.A.,Young J.W., Beitz D.C. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. Canadian Journal of Animal Science 2005, 85(2):165-175.
19. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H., Sordillo L.M. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. Journal of Dairy Science 2010, 93(6):2508–2516.
20. Sordillo L.M., Aitken S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology 2009, 128(1-3):104–109.

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 2, No1, 2021
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 636.09
Smajlović et al., pp 33-48

TRAUMATSKA KOAGULOPATIJA U PASA

TRAUMATIC COAGULOPATHY IN DOGS

Ana Smajlović[a], Tina Hundrić[b], Bojan Toholj[c], Marko Cincović[c], Marko Pećin[a], Marija Lipar[a], Ozren Smolec[a]*

[a]*Sveučičište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska*
[b] *Veterinarska ambulanta Križevci, Potočka 35, 48260 Križevci, Hrvatska*
[c]*Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija*
[a]*University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Clinic of Surgery, Orthopedics and Ophthalmology, Heinzelova 55, 10000 Zagreb Croatia*
[b]*Veterinary clinic Križevci, Potočka 35, 48260 Križevci Croatia*
[c]*University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia*
**Autor za kontakt: osmolec@vef.hr*

SAŽETAK

Traumatska koagulopatija u pasa kao izrazito endogeno stanje razvija se rano u postraumatskom razdoblju (≤ 1 sat). Neposredna i rana smrtnost uzrokovane traumom posljedica su primarno ozljeda mozga ili značajnog gubitka krvi (hemoragičnog šoka), dok su uzroci kasnijoj smrtnosti posljedica sekundarnih ozljeda mozga te neuspjeli imunološki odgovor organizma pacijenta.Prve nokse (hipoksija, hipotenzija, ozljede organa i mekih tkiva, frakture), a kasnije i sekundarne posljedice (ishemija, reperfuzijske ozljede, operativni zahvati, infekcije) potiču obrambeni odgovor organizma na doživljenu traumu. Obrambeni odgovor sastoji se od lokalnog i sustavnog oslobađanja pro-upalnih citokina, metabolita arahidonske kiseline, proteina koagulacijskog sustava, komplementa i proteina akutne faze a također i hormonalnih medijatora. Prema kliničkim parametrima, takav imunološki odgovor definira se kao sistemni upalni odgovor (SIRS). Paralelno sa pro-upalnim medijatorima oslobađaju se i protu-upalni medijatori čineći takav odgovor kompenzatorno protuupalnim sindromom (CARS). Neravnoteža između dva navedena odgovora imunološkog sustava, smatra se uzrokom posljedične disfunkcije organa odnosno organizma kao i povećanu prijemljivost infekcijama. Akutna traumatska koagulopatija (ATC) je dinamičan proces multifaktorijalne prirode. Čini se kako su opsežne ozljede tkiva u kombinaciji sa sistemnom hipoperfuzijom dva glavna pokretača ATC. Međutim aktivacija neurohormonalnog odgovora, sustavne upale i diseminiranihendotelnih oštećenja također mogu imati bitnu ulogu kao čimbenici razvoja. Oštećenje stanica endotela, nakupljanje leukocita, diseminirana intravaskularna koagulopatija (DIC) sa smetnjama u mikrocirkulaciji vode do apoptoze i nekroze stanica parenhimskih organa sa razvojem sindrome multiple organske disfunkcije (MODS) odnosno do zatajenja više organa (MOF).

Ključne reči: akutna traumatska koagulopatija, koagulacija, sindrom sustavnog upalnog odgovora, diseminirana intravaskularna koagulopatija, reanimacija

ABSTRACT

Traumatic coagulopathy in dogs as a highly endogenous condition develops early in the post- traumatic period (≤ 1hour). Immediate and early trauma mortality is primarily due to brain injury or significant blood loss (hemorrhagic shock), while late mortality is caused by secondary brain injury and failure of the patients immune response. First hits (hypoxia, hypotension, organ and soft tissue injuries as well as fractures) and later, secondary hits (ischemia, reperfusion injuries, surgery interventions, infections) stimulate patients defence response to experienced trauma. The defence response consists of the local and systemic release of pro-inflammatory cytokines, arachidonic acid metabolites, protein softhe contact phase and coagulation cascade, complement and acute-phase proteins and also hormonal mediators. According to clinical parameters such an immune response is defined as a systemic inflammatory response syndrome (SIRS). In parallel with the pro-inflammatory mediators, anti-inflammatory mediators are released making such a response the compensatory anti- inflammatory syndrome (CARS). An imbalance between the two responses of the immune system is considered to be the cause of the consequent organ disfunction as well as the increased susceptibility to infections. Acute traumatic coagulopathyis (ATC) a dynamic process of a multifactorial nature. Combination of the extensive tissues injuries as well as systemic hypoperfusion appear to be two major drivers of ATC. However activation of the neurohormonal response, systemic inflammation and disseminated endothelial damage may also play an essential role as development factors. Endothelial cell damage, accumulation of leukocytes, disseminated intravascular coagulopathy with disorders of microcirculation leads to apoptosis and necrosis of parenchymal organ cells with development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS), or multiple organ failure (MOF).

Key words: acute traumatic coagulopathy, coagulation, systemic inflammatory response syndrome, disseminated intravascular coagulation, resuscitation

POPIS KARTICA

ADP- adenozindifosfat
AMP- adenozinmonofosfat
aPTT- aktivirano parcijalno protrombinsko vrijeme
ARDS- akutni respiratorni distres sindrom (engl.
ATC- akutna traumatska koagulopatija (engl. *Acute traumatic coagulopathy*)
ATP- adenozintrifosfat
Ca- kalcij
CARS- kompenzatorni protuupalni sindrom (engl. *Compensatory Anti inflammatory Response Syndrome)*
DIC- diseminirana intravaskularna koagulopatija (engl. *Disseminated intravascular coagulation*)
DNA- deoksiribonukleinska kiselina
F (V, VIII, XII)- faktori zgrušavanja
F (V, VIII, X, XI, XII) a- aktivirani faktori zgrušavanja
FDP's- sibrinskirazgradni produkti (engl. *fibrindegradationproducts*)
Htc- hematokrit
IC- ijatrogena koagulopatija

IL- (1, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18, 1β) - interleukini
ISS- engl. *Injury Severity Score*
MARS- sindrom mješanog antagonističkog odgovora (engl. *Mixed antagonistic response syndrome*)
MMF- migracijski faktor makrofaga
MODS- sindrom višestruke organske disfunkcije (engl. *Multiple Organ Dysfunction*Failure)
MOF- sindrom multiorganskog zatajenja (engl. *multiple organ failure*)
PMNL- polimorfonuklearni leukociti
pRBCs- engl.*packed red bloodcells*
PT- protrombinsko vrijeme
ROTEM- rotacijska tromboelastografija
SIRS- sindrom sustavnog upalnog odgovora (engl.*systemicinflammatoryresponsesyndrome)*
TEG- tromboelastografija
TNF- faktor tumorske nekroze (engl. *tumor necrosisfactor*)
t-PA- tkivni aktivator plazminogena
TTP- ukupni proteini u serumum
u- PA- urokinazi sličan aktivator plazminogena
vWF- von Willebrandov faktor

UVOD

Trauma je definirana kao svaka fizička ozljeda uzrokovana djelovanjem vanjskih mehaničkih, fizičkih, kemijskih i toplinskih čimbenika nanesena čovjeku ili životinji (1). Fizičku ozljedu mogu uzrokovati sve nepenetrirajuće (tupe), odnosno penetrirajuće traume. Tupe ozljede uključuju traumu uzrokovanu naletom vozila, gnječne te kompresijske ozljede (2).

Postraumatsko krvarenje i dalje je jedan od glavnih uzroka smrti. Masivno krvarenje čini 30-56% prehospitalnih posttraumatskih smrti dok je koagulopatsko krvarenje jedno od glavnih uzroka smrtnih slučajeva koji se mogu spriječiti u prva 24 sata nakon traume (3). Posttraumatsko krvarenje inducira ranu smrtnost na način da produljuje vrijeme krvarenja i smanjuje stupanj prokrvljenosti. Smrt obično nastupa u prvih 6 sati od traume. Po dolasku na hitni prijam, u jednog od četiri pacijenta, je utvrđeno hemostatsko i hemodinamično iscrpljivanje što se može okarakterizirati kao koagulopatija izazvana traumom koja se može razlikovati kao akutna traumatska koagulopatija (ATC) i/ ili ijatrogena koagulopatija (IC) (4). Akutna traumatska koagulopatija predstavlja endogeno stanje hipokoaguloacije koje se javlja manje od jednog sata nakon traume. Nastaje kao posljedica ozljede tkiva i sustavne hipoperfuzije, a fenotipski se manifestira kao sustavna hipokoagulacija i hiperfibrinoliza.

Smrtnost (10-30%) koja se javlja u naredna 24 sata prvenstveno se pripisuje hipoksiji i hipovolemiji uslijed neprekidnog unutarnjeg krvarenja. Uzrok smrti su koagulopatijom uzrokovan gubitak krvi odnosno zatajenje rada srca i krvožilnog sustava. Ukoliko pacijenti prežive prva 24 sata nakon pretrpljene traume naknadno mogu doživjeti sepsu, sindrom disfunkcije više organa (MODS) a naposlijetku i smrt (5).

Prepoznato je da aktiviranje kaskade koagulacije uobičajen ishod nakon traume, a težina ozljede i stupanj šoka proporcionalni su stupnju koagulopatije. Kliničko i laboratorijsko iskustvo pokazalo je da odstupanja u kaskadi koagulacije imaju glavnu ulogu u posredovanju rane (< 24 sata) odnosno kasne (> 24 sata) postraumatske smrtnosti (6). Kasnija smrtnost posljedica je sposobnosti koagulacije da modulira imuno-upalni odgovor koji naposlijetku dovodi do razvoja akutne ozljede pluća, sepse i MODS-a. Iako nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi odgovorni za ovu traumatsku koagulopatiju, smatra se da su multifaktorijalni i vremenski osjetljivi u prirodi, a u interakciju su uključene sve komponente hemostaze i upalnog sustava.

Lokalna hemostaza i tromboza za cilj imaju potaknuti fiziološko cijeljenje rane i imunosni odgovor. Ako se sistemna upala nadvlada velikim oštećenjem tkiva i hipoperfuzijom tada oba procesa potiču razvoj sistemne diseminirane intravaskularne koagulopatije (DIC) koja je povezana sa patološkom fibrinogenlizom (5). Također je opisano kako je ATC proporcionalna stupnju težine ozljede (ISS), te se razvija neovisno o primjeni prehospitalne tekućine sa posljedičnim

razvojem hemodilucije a povezuje se sa povećanim rizikom za ranu smrt (7). Prisutnost akutne traumatske koagulopatije ometa reanimativne napore, pogoršava gubitke krvi, povećava potrebu za transfuzijom te produljuje hipoperfuziju odnosno povećava rizik od razvoja trajnog hipovolemijskog šoka čime izravno utječe na ishod traume (8).

MATERIJAL I METODE (Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja)

FIZIOLOGIJA HEMOSTAZE

Hemostaza je proces zaustavljanja krvarenja iz oštećene krvne žile. U taj su proces uključeni vaskularni, trombocitni i plazmatski faktori, a na kraju nastupa fibrinoliza.

Vaskularni faktori

Lokalnom vazokonstrikcijom smanjuje se gubitak krvi zbog ozljede krvne žile. Oštećena stijenka krvne žile pokreće aktivaciju i prijanjanje trombocita te stvaranje fibrina sa ciljem stvaranja ugruška (9).

Trombocitni faktori

Trombociti su krvne pločice, bez jezgre, koje nastaju u koštanoj srži iz prekurzorskih stanica megakariocita. Njihovu tvorbu iz megakariocita potiče trombopoetin. U cirkulaciji su slobodni i životni vijek im je 7-10 dana, dok se 1/3 trombocita nalazi sekvestrirana u slezeni. Trombociti u sebi imaju granule: α granule koje sadrže vWF (von Willebrandov fakor) i faktor V (aktivirani faktor V postaje kofaktorXa u kompleksu koji aktivira protrombin) te zbijene granule koje sadrže serotonin i adenozindifosfat (ADP) koji je važan za aktivaciju okolnih trombocita a također potiče stvaranje tromboksana A_2 (9). Kako je prije navedeno, po oštećenju endotela trombociti prianjaju na oštećenu intimu (vWF) i usidre se na žilnu stijenku. U dodiru sa vWF endotel mijenja konformaciju i veže se sa trombocitima i aktivira ih. Trombociti počinju bubriti, poprimaju nepravilne oblike sa izdancima, postaju ljepljivi te otpuštaju medijatore pohranjene u zrncima. Na taj način trombociti tvore površinu za slaganje i aktiviranje koagulacijskih kompleksa sa stvaranjem trombina. Trombocite povezuje fibrinogen koji se veže na glikoproteinske receptore na trombocitima. Trombin pretvara fibrinogen u fibrin, a fibrinske niti vežu agregirane trombocite čime se učvrščuje trombocitno- fibrinski hemostatski čep. Nekoliko sati kasnije dolazi do retrakcije ugruška (10).

Aktivacija plazmatskog kaskadnog sustava

Pro-upalni medijatori, citokini te metaboliti arahidonske kiseline kao i toksini aktiviraju plazmatski kaskadni sustav koji se sastoji od: kaskade komplemenata, kalikrein-kinin sustava i kaskade zgrušavanja krvi. Klasični put aktivacije komplementa potiče kompleks antigen-protutijelo (Ag-Pt) (imunoglobulini razreda M ili G) ili aktivirani faktor zgrušavanja FXIIa, dok bakterijski produkti aktiviraju alternativni put. Opsonini su važni za proces opsonizacije vezanjem na površinu patogena, odnosno potrebni su za fagocitozu staničnog detritusa i bakterija. Sa druge strane anafilatoksini (C3a i C5a) potiču kemotaksiju (ameboideno kretanje prema kemoatraktantu) aktiviranjem fagocitnih

stanica (polimorfnonuklearnih leukocita, monocita, makrofaga), pojačavaju jetreni odgovor na akutnu fazu. Osim navedenog također potiču degranulaciju masnih stanica i bazofila sa posljedičnim oslobađanjem vazoaktivnih medijatora (histamina) te potiču adheziju leukocita na endotelne stanice krvnih žila što povećava njihovu propusnost sa nastankom edema (9). Plazmatski proteini FXII, prekalikrein, kininogen i faktor XI predstavljaju dio kontaktne faze. FXII i prekalikrein se međusobno aktiviraju pa nastaje FXIIa i kalikrein. Aktivirani FXIIa potiče kaskadu komplementa klasičnim putem. Kalikrein potiče fibrinolizu na dva načina, prvo poticanjem pretvaranja plazminogena u plazmin, odnosno aktivacijom urokinazi sličnom aktivatoru plazminogena (u-PA) uz kofaktor tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA). Aktivirani vanjski odnosno unutarnji put zgrušavanja pokreće zajednički put zgrušavanja koji dovodi do stvaranja fibrinskog ugruška kao završnog koraka u hemostazi. Stvaranje fibrinskog ugruška odvija se u tri faze.

Fibrinoliza

Fibrinoliza predstavlja otapanje ugruška a bitna je da se spriječi širenje ugruška. Nakon uspostavljene hemostaze, oslobađanjem faktora rasta iz aktiviranih trombocita popravlja se oštećena stijenka krvne žile. Formirani tromb u sebi ima ugrađen plazminogen (protein plazme) koji se razgrađuje pod utjecajem enzima plazmina i tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA). Tkivni aktivator plazminogena (t-PA) oslobađa se iz okolnih endotelnih stanica kao odgovor na stazu krvi odnosno na prisutnost trombina. Plazminogen se posredovanjem t-PA pretvara u plazmin koji se veže na fibrin kojeg razgrađuje na fibrinske razgradne produkte (FDP's, engl. Fibrin degradation products) što dovodi do otapanja ugruška. Razgradne produkte fibrina, trombocite i preostali stanični debris fagocitira monocitno-makrofagni sustav. Postoji više aktivatora plazminogena. Tkivni aktivator plazminogena (t-PA) podrijetlom iz endotelnih stanica, je vrlo učinkovit kada se veže sa plazminogenom na fibrinski ugrušak. Drugi oblik je jednolančana odnosno dvolančana urokinaza (u-PA). Jednolančana urokinaza ne može aktivirati slobodni plazminogen, ali slično kao t-PA, brzo ga aktivira vezana na fibrin. Urokinazu luče epitelne stanice izvodnih puteva (bubrega, ili mliječne žlijezde) gdje predstavlja fiziološku kontrolu fibrinolize (9).

ETIOLOGIJA NASTANKA TRAUMATSKE KOAGULOPATIJE

Prijašnje teorije u vezi traumatske koagulopatije zagovarale su da njen uzrok leži u gubitku i disfunkciji odnosno razrjeđenju faktora zgrušavanja i trombocita. Uzrok gubitka pripisivao se obilnim krvarenjima te potrošnji faktora koagulacije i trombocita. Hemodilucija kao posljedica obilne tekućinske terapije zajedno sa inhibitornim učincima konkurentne metaboličke acidoze i hipotermije također doprinose navedenim gubitcima (11). Trenutno shvaćanje, stvoreno na temelju višegodišnjih istraživanja i meta analiza, akutnu traumatsku koagulopatiju tumači kao endogenu koagulopatiju koja je u direktnoj vezi sa nastalim šokom kao posljedica traume, a razvija se unutar 30 minuta nakon traume (12). Utvrđeno je da nastaje prije pokušaja oživljavanja odnosno prije utjecaja popratne metaboličke acidoze i hipotermije, te da je neovisna o gubitku, potrošnji i razrjeđenju faktora zgrušavanja i trombocita (13). U novije vrijeme ovaj fenomen navodi se kao ″ATC″ rana koagulopatija traume, odnosno ″akutna koagulopatija traume šoka″, a u preostalom dijelu ovog rada označit ćemo je kao ATC odnosno akutna traumatska koagulopatija. Traumom posredovana koagulopatija može se definirati i kao nemogućnost koagulacijskog sustava u održavanju homeostaze nakon traume. Poremećaji u zgrušavanju mogu se uočiti već u hiperakutnoj postraumatskoj fazi (12). Traumatska koagulopatija nastaje kao posljedica ozljede tkiva i sustavne hipoperfuzije, a karakterizira ju sustavna

antikoagulacija i hiperfibrinoliza (12). Trenutno se navode 3 hipoteze kojima se pokušava objasniti mehanizam nastanka ATC kao stanja hipokoagulacije i hiperfibrinolize a uključuju DIC fibrinolitičkog fenotipa, trombomodulin-trombin sustav aktiviran putem proteina C kao i značajan simpatički odgovor preko nadububrežnih žlijezda koji za posljedicu ima oštećenje endotela izazvano katekolaminima (14).

Hipoteze nastanka traumatske koagulopatije

Prema današnjim saznanjima prevladavaju 3 hipoteze kojima se pokušava objasniti osnovni patofiziološki mehanizam razvoja akutne traumatske koagulopatije sa kliničkom manifestacijom razvoja sustavnog stanja smanjenog zgrušavanja krvi sa hiperfibrinolizom.

1. Prva hipoteza tvrdi kako je ATC fenotipska varijacija klasičnog DIC-a.

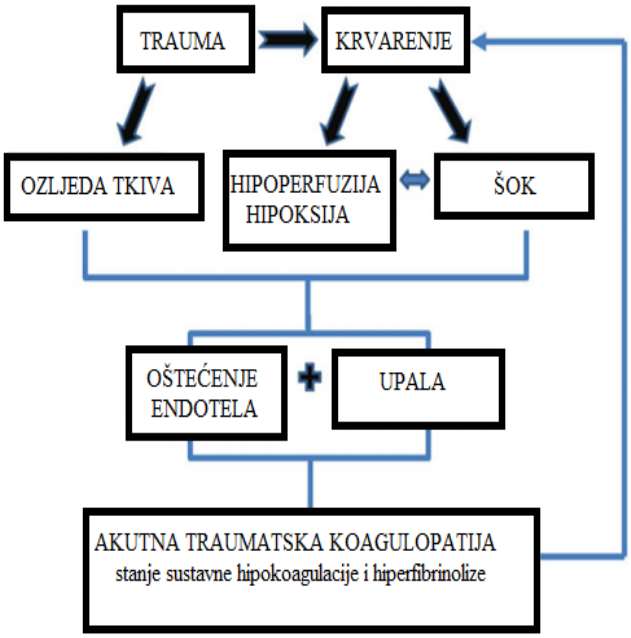
DIC se u početku manifestira više kao protrombotičko i hiperkoagubilno stanje koje, ukoliko osnovni uzrok potraje, napreduje u hipokoagubilni i hemoragični poremećaj. Mišljenici ove teorije zagovaraju kako u prvih 24-48 sati nakon traume pacijenti doživljavaju DIC fibrinolitičkog fenotipa. Nakon isteka navedenog vremena osnovni koagulopatski uzrok napreduje u DIC trombotičkog fenotipa (14).

2. Suprotno prvoj hipotezi, druga hipoteza tvrdi kako ATC u početku nije potrošna koagulopatija, već je posljedica smanjene razgradnje trombina i povećane aktivnosti trombomodulina što uzrokuje povećanu aktivaciju trombin-trombomodulin protein C antikoagulantnog puta (12). Primarni stimulatori nastanka ATC-a u ovoj hipotezi, smatraju se, teške ozljede tkiva i hipoperfuzija.

3. Neurohormonalna hipoteza objašnjava ulogu posttraumatskog simpato-adrenalnog odgovora sa posljedičnim katekolaminima induciranog oštećenja endotela kao sastavnu komponentu fenotipskog izražavanja akutne traumatske koagulopatije. Trauma sa oštećenjem tkiva pobuđuje simpato-adrenalni odgovor sa posljedičnim otpuštanjem katekolamina u cirkulaciju. Cirkulirajući katekolamini direktnim oštećenjem glikokaliksa endotela, omogućavaju lokalnoj hemostazi djelovanje na mjestu ozljede. Kako bi se spriječilo sistemno zgrušavanje i očuvala lokalna perfuzija, organizam pokušava uravnotežiti učinke protrombotičkog endotela sa antikoagulobilnim i fibrinolitičkim odgovorom u tekućoj fazi (puna krv) (15).

Pokretači traumatske koagulopatije

Utvrđeno je šest ključnih faktora koji utječu na razvoj ATC: tkivna ozljeda, hipoperfuzija, sistemni upalni odgovor, metabolička acidoza, hipotermija, te hemodilucija. Unatoč navedenim čimbenicima, u svijetu su kao dva glavna pokretača nastanka ATC-a prihvaćeni šok (kao posljedica tkivne hipoperfuzije) te stupanj oštećenja tkiva (16).



Slika 1. Pokretači akutne traumatske koagulopatije (8).

PATOFIZIOLOGIJA

Teorija dva udarca (two hit-theory)

Odgovor organizma na ozljedu, kao kompleksne kaskadne reakcije, stimuliran je primarnim i sekundarnim inzultima (teorija dva udarca). Trauma, ozljeda ili fraktura, zahvaća primarni organ sa posljedičnim lokalnim oštećenjem i sustavnim upalnim odgovorom (prvi udarac, opterećenje traume). Na pokretanje i jačinu post traumatskih komplikacija presudnu ulogu imaju i sekundarni endogeni te egzogeni faktori. U tipične endogene faktore (antigensko opterećenje) ubrajamo respiratorni distres sa posljedičnom hipoksijom, kardiovaskularni kolaps, metaboličku acidozu, ishemiju odnosno reperfuzijske ozljede te odumrlo tkivo, kontaminirane katetere odnosno kontaminirane tubuse kao i infekcije (17). Kirurške intervencije rana sa teškim oštećenjem tkiva, pothlađenost odnosno krvarenje sa gubitkom krvi, neadekvatna i zakašnjela kirurška odnosno intenzivna njega zapuštenih ozljeda, kao i obilna transfuzija predstavljaju egzogene sekundarne udarce (intervencijsko odnosno kirurško opterećenje) (18). Raznovrsnost jačine ozljeda (kontuzije, laceracije, lomovi) u kombinaciji sa posljedičnom perfuzijom organa utječu na post traumatski sustavni upalni odgovor. Najveća stopa razvoja SIRS-a zabilježena je u pacijenata sa izoliranim ili kombiniranim teškim ozljedama glave (19).

Sindrom sistemne upalne reakcije (SIRS)

Oštećenje tkiva razvija se proporcionalno težini ozljede (eng. Trauma load), genetskim faktorima (genski polimorfizam), dispoziciji organizma, kao i lokalno te sustavno proizvedenim proupalnim i protuupalnim citokinima te fosfolipidima što također ovisi i o vrsti antigena (eng. Antigenic load). U kompleksnom imunološkom odgovoru, lokalno i sustavno, sudjeluju proupalni citokini, sustav komplementa, proteini kontaktne faze i koagulacijske kaskade, neuroendokrini medijatori kao i lokalno nakupljanje imunokompetentnih stanica. Citokini su polipeptidi pleiotropnog afiniteta koji djeluju parakrino i autokrino. Hiperakutni citokini (TNFα i IL-1β) djeluju nakon 1-2 sata, a postoje i subakutni (sekundarni) citokini: IL-6, IL-8 (NAF- peptid koji aktivira neutrofile), MMF-migracijski faktor makrofaga, IL-12 i IL-18.

Povišene serumske razine TNFα, IL-1β ili IL-8 uočene su u pacijenata sa sistemnom upalom, zatim u tekućini dobivenoj bronhoalveolarnomlavažom u pacijenata sa traumom prsnog koša ili u slučajevima akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS). Osim navedenih parametara, serumske vrijednosti IL-6 koreliraju sa ISS (*injury severity score*) te sa učestalošću razvoja MODS-a, ARDS-a, sepse i njihovih nepovoljnih ishoda (20). T-pomoćnički limfociti se pod utjecajem antigena diferenciraju u T_H1 i T_H2 limfocite. T_H1 limfociti podržavaju proupalnu kaskadu tako što potiču sekreciju IL-1, interferona-γ i TNF-β. Za razliku od njih, T_H2 limfociti su važni za stvaranje protu-upalnih medijatora. Monociti / makrofagi su preko sekrecije IL-12 uključeni u diferencijaciju T_H1 limfocita. Potisnuta proizvodnja IL-12, nakon traume, ukazuje na pomak u omjeru T_H1/ T_H2 u korist T_H2 limfocita što ima nepovoljan klinički ishod (21). Proupalni citokini aktiviraju privlačenje i fagocitnu aktivnost polimorfonuklearnih leukocita (PMNL) u prvih nekoliko sati, a također ih stimuliraju na oslobađanje proteaza i slobodnih kisikovih radikala (oksidativni stres) (22). PMNL sa jedne strane potiču monocitno-, granulocitnu poezu, dok sa druge strane smanjuju apoptozu PMNL u tijeku sepse i SIRS-a. Na smanjenje apoptoze neutrofila djeluju i neki drugi proupalni medijatori na način da potiču nakupljanje polimorfonuklearnih leukocita na mjestu lokalnog tkivnog oštećenja.

Mehaničko oštećenje stanica kao i oštećenje nastalo kao posljedica hipoksije utječu na unutarstaničnu koncentraciju kalcija (Ca^{2+}). Uslijed povećanja koncentracije intracelularnog kalcija (Ca^{2+}) dolazi do aktivacije fosfolipaze A_2 (PLA_2) i fosfolipaze C (PLC) (23). Navedeni enzimi kataliziraju oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipidne membrane, a aktivacijom enzima ciklooksigenaze proizvode se prostangladini (PGE_2), leukotrieni B_4 (LTB_4) i tromboksani

A_2. Važnost navedenih metabolita sastoji se u tome što su uključeni u privlačenje upalnih stanica, regulaciju permeabilnosti krvnih žila kao i nakupljanje i aktivaciju trombocita te makrofagnu aktivnost. Intenzivna upalna reakcija dovodi do kliničke manifestacije SIRS-a sa posljedičnim razvojem MODS-a i MOF-a (24).

Kompenzatorni protuupalni odgovor (CARS)

Ovisno o težini ozljede i posljedičnom postraumatskom tijeku oslobađaju se i protuupalni medijatori. T_H2 limoficiti i monociti / makrofagi oslobađaju IL-4, IL-10, IL-13 ili TGF-β (transformirajući faktor rasta-β). Serumska razina IL-10 korelira sa ISS i razvojem postraumatskih komplikacija (MODS, ARDS ili razvojem sepse) (25). U ranoj fazi postraumatskog tijeka uočena je limfocitopenija koja se povezuje sa morbiditetom i ishodom traume. Navedena limfocitopenija može biti povezana i sa porastom apoptoze potaknute stresnim hormonima (steroidima) i smrću stanica proteina (26). U ranoj fazi postraumatskog tijeka uočena je limfocitopenija koja se povezuje sa morbiditetom i ishodom traume. Navedena limfocitopenija može biti povezana i sa porastom apoptoze potaknute stresnim hormonima (steroidima) i smrću stanica proteina (26). Imunološki odgovor domaćina pokušava uspostaviti ravnotežu između SIRS-a i CARS-a, sa jedne strane izazivajući mehanizme reparacije i onemogućavanjem ulaska odnosno preopterećenje mikroorganizmima, a sa druge strane izbjegavajući auto-agresivnu upalu sa sekundarnim oštećenjem tkiva i posljedičnom prijemljivošću na infekciju (27). Ovakvi mješoviti upalni mehanizmi nazivaju se sindromom miješanog antagonističkog odgovora (engl. MARS- mixed antagonistic response syndrome) (28).

Ishemija i reperfuzijska ozljeda

Sistemna hipoksemija i hipotenzija, lokalna hipoperfuzija uzrokovana kontuzijama, laceracijama, te ozljedama krvožilja, vode u nedostatak kisika u endotelu, parenhimu te stanicama imunološkog sustava koji takve promjene pokušavaju kompenzirati intracelularnom degradacijom APT-a (adenozintrifosfat) u AMP (adenozinmonofosfat). Posljedično staničnoj potrošnji ATP-a dolazi do porasta unutarstaničnog natrija (Na^{2+}), bubrenja stanice ali i do promjene u permeabilnosti stanične membrane uslijed promjena u „energiji ovisnoj“ Na/K ATP-aznoj pumpi. Nadalje, deficit ATP-a utječe na povećanje citosolnog Ca^{2+} sa metaboličkim utjecajem na razinu glukoze, proteina, oslobađanje neurotransmitera i hormona, sa aktivacijom enzima kao što su fosfolipaze, proteaze i endonukleaze. Opisani slijed događaja uzrokuje dezintegraciju stanične membrane sa oštećenjem DNA. Navedena ireverzibilna stanična oštećenja (apoptoza i nekroza) nastala kao posljedica manjka energije, uočavaju se u produljenih, dugotrajnih krvarenja i u slučajevima nedetektiranih ozljeda krvnih žila. Reperfuzijska ozljeda, kao posljedica sekundarnih oštećenja organa i tkiva, javlja se uslijed nakupljanja hipoksantina koji se u nizu metaboličkih reakcija razgradi u mokraćnu kiselinu koja reagira sa slobodnim kisikom u stanici. Produkti ovakvog metabolizma su vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni ion (OH^-). Navedeni spojevi utječu na homeostazu stanice i unutarstanične koncentracije Ca^{2+}. Potiču peroksidaciju lipida stanične membrane i dezintegraciju DNA sa posljedičnom apoptozom odnosno nekrozom zahvaćenih stanica (enotelnih, parenhimskim, i stanica imunološkog sustava) (29).

Diseminirana intravaskularna koagulopatija (DIC)

Prema definiciji diseminirana intravaskularna kagulopatija je stečeni sindrom različitih uzroka kojeg karakterizira intravaskularna aktivacija koagulacije sa gubitkom lokalizacije. Navedeni sindrom može nastati podrijetlom oštećenja mikrocirkulacije koje ukoliko je znatno može uzrokovati zatajenje organa (30). DIC je klinički sindrom koji uzrokuje hipokoagulaciju preko upale i hemostaze. Aktiviranjem koagulacije akumuliraju se trombin i fibrin što rezultira trombozom malih i srednjih krvnih žila. Spomenuti slijed događaja može biti uzrokom multiorganske disfunkcije organa.

Diseminirano stvaranje trombina troši trombocite, faktore zgrušavanja te regulatorne faktore (antitrombin). Opisani sindrom javlja se u nekoliko faza: subkliničkoj fazi, fazi zatajenja organa te u „otvorenoj“ fazi odnosno krvarenju (31).

Sindrom višestruke disfunkcije organa (MODS)

Razvoj fiziološke i sistemne upale nakon traume sa zatajenjem obrambenog sustava domaćina povezan je sa nepovratnim oštećenjem organa i visokom stopom smrtnosti. Takva upala može se opisati kao preopterećenje primarnih i sekundarnih inzulta sa neravnotežom između pro-upalnih i protu-upalnih medijatora (32). Oštećenje endotela stanica, disfunkcija vaskularne permeabilnosti sa kapilarnim curenjem, poremetnje u mikrocirkulaciji sa staničnom hipoksijom te naposljetku apoptozom i nekrozom zahvaćenih stanica, tkiva i parenhima, sudjeluje u višestrukom zakazivanju funkcije organa (MODS) odnosno zatajenju više organa (MOF- multiple organ failure).

KLINIČKA SLIKA

Šok kao posljedica krvarenja česta je komplikacija traumatskih ozljeda. Hipovolemijski odnosno hemoragijski šok nastaje zbog smanjenja ukupnog volumena krvi. Podrazumijeva stanje hipoperfuzije organa uslijed kojeg dolazi do oštećenja stanica i njihove smrti. Opisana su tri klinička stadija šoka: kompenzacijski stadij, rani dekompenzacijski i dekompenzacijski stadij (10). Klinički znakovi kompenzacijskog šoka su: tahikardija, tahipneja, zažarene sluznice, ubrzano vrijeme ponovnog punjenja kapilara, normalni ili povišeni krvni tlak, a periferni puls je oslabljen i brz. Ekstremiteti i uške su hladni i znojni (33). Klinički znakovi rane dekompenzacijske faze šoka su: tahikardija, hipotenzija, blijede vidljive sluznice, produženo vrijeme ponovnog punjenja kapilara, normalni ili smanjeni pulsni tlak te hipotermija. Klinički znakovi dekomopenzacijskog šoka su: bradikardija, blijede odnosno cijanotične sluznice, slab ili odsutan puls, jaka hipotermija, anurija te koma. Ovisno o tipu krvarenja (unutarnje ili vanjsko), stupnju i akutnosti istoga, pacijenti mogu iskazivati prethodno navedene simptome šoka. Također se mogu javiti sistemni znakovi anemije i hipoproteinemije. Također česta komplikacija koja se javlja je i DIC. U stanjima u kojima se sistemna upala nadvlada velikim oštećenjem tkiva i hipoperfuzijom, dolazi do razvoja DIC-a. U krvarenju se aktivira kaskada koagulacije koju karakterizira koagulopatija potrošnje, dolazi do nedostatne kontrole zgrušavanja te povećane fibrinogenolize. Uslijed pojačanog stvaranje i aktivacije krvnih ugrušaka oštećuje se endotel mikrocirkulacije. U stanju DIC-a krv se može pojačano grušati i stvarati mikro trombe (hiperkoagulacija) odnosno uslijed potrošne koagulopatije mogućnost zgrušavanja je smanjena (hipokoagulacija) (30). Klinički znaci DIC-a uključuju: krvarenje iz nosa, krv u oku, petehije, ekhimoze, ubrzani srčani otkucaji, otežano disanje, ubrzano disanje te abnormalno krvarenje iz tjelesnih otvora (33).

DIJAGNOSTIČKA PROCJENA AKUTNE TRAUMATSKE KOAGULOPATIJE

Podatci dobiveni iz humane medicine, pokazuju da 10-25% bolesnika sa traumom doživi ATC koja se očituje u produljenom krvarenju, odnosno produživanju napora zaustavljanja krvarenja, promicanju sepse te povećava smrtnost za 4 puta. Činjenica da je akutna traumatska koagulopatija dinamične prirode i progresivnog karaktera kroz različite faze koagulopatije, predstavlja izazov za brzo i učinkovito otkrivanje ATC-e. Osim toga mora se razmotriti kako svaka faza ove dinamične koaguloaptije može zahtijevati svojstveno različite krvne proizvode sa ciljem smanjenja trenutne koagulopatije (14).

Da bi se suzbili učinci ATC i povećala stopa preživljavanja, neophodno je biti u mogućnosti:

1. Identificirati akutnu traumatsku koagulopatiju u prvom satu od trijaže pacijenta
2. Uspostaviti ciljanu terapiju odgovarajućim sredstvima koja sadrže krv te sprječavaju daljnje aktualno krvarenje (34)

Kako postaviti dijagnozu ATC u veterinarskog pacijenta?

Nažalost nema standardnog, odobrenog testa odnosno indeksa predviđanja, niti u humanoj niti u veterinarskoj medicini, za pouzdano i/ili točno prepoznavanje akutne traumatske koagulopatije. Viskoelastični testovi (TEG i ROTEM) osjetljivi su za rano otkrivanje ATC, no većina veterinarskih klinika i stanica trenutno nema na raspolaganju pristup navedenim testovima. Zbog toga je postavljanje dijagnoze akutne traumatske koagulopatije u naših, veterinarskih, pacijenata poprilično izazovno. Može se temeljiti na kliničkoj prosudbi i intuiciji uzimajući u obzir pacijentovu povijest bolesti, stanja po dolasku u ambulantu kao i prema početnim laboratorijskim podatcima (BD, koncentraciji laktata, krvni tlak, aPTT/PT).

REANIMACIJSKE STRATEGIJE

Kontrola hemostaze

Rani i brzi pristup zaustavljanju krvarenja, jedan je od glavnih prioriteta prilikom sanacije hemoragijskog šoka. Međutim, navedeni pristup često je kompliciran i otežan zbog nepristupačnosti samom mjestu krvarenja. Krvarenja koja se nalaze na ekstremitetima, s druge stane, jednostavno su dostupna te se mogu provesti zahvati "rane hemostaze", kao što su kompresija, postavljanje hemostatskih povoja, sredstava ili čak podveza na proksimalnim arterijama (35). U pasa i mačaka, pod kompresijske rane spadaju rane koje se nalaze na ušima, ekstremitetima te na repu. Površinske rane na prsima, vratu, leđima, gornjim djelovima ekstremiteta i perineumu, također spadaju u kompresibilnu hemoragijsku kategoriju, međutim, ovisno o veličini rane, rane na takvim mjestima često podliježu samo djelomičnoj kompresiji (36). Glavni cilj, u pacijenata sa nekontroliranim krvarenjima koja nisu podložna kompresiji jest identifikacija lokalizacije krvarenja sa brzom intervencijom kako bi se umanjio gubitak krvi. Također je potrebno istovremeno održavati efektivni cirkulatorni volumen i hemodinamičku stabilnost. To se postiže ranom kirurškom intervencijom i sanacijom krvarenja, posebno u pacijenata u kojih krvarenje nije zaustavljeno kompresijskom metodom (37). Na sreću, nisu sva nekompresibilna krvarenja opasna za život te ih je moguće sanirati medikamentoznom terapijom. Hoće li se pristupiti kirurškoj ili medikamentoznoj sanaciji ovisi o hemodinamskoj stabilnosti pacijenta, obimu krvarenja, dostupnosti osoblja te se osobito u veterinarskoj medicni ne smije izostaviti i financijski trošak. Međutim, CROCE i sur., su u svojoj studiji pokazali da je neoperativni pristup u pacijenata sa jetrenim krvarenjima, kao posljedica djelovanja tupe sile, siguran ukoliko se radilo o hemodinamički stabilnim pacijentima, a također se pokazalo da se javljalo manje komplikacija nego u pacijenata koji su podvrgnuti kirurškom tretmanu (38). Kako životinje nisu hemodinamički stabilne, te zbog prisutnosti opsežnih krvarenja i potencijalno oštećenja vitalnih organa nije preopručeno primjenjivati terapiju nesteroidnim protuupalnim lijekovima (39).

Tablica 2. Glavne točke u liječenju terapije pacijenta sa akutnom traumatskom koagulopatijom (8).

GLAVNE TOČKE U LIJEČENJU PACIJENTA SA ATC
Primarni cilj je zaustavljanje krvarenja
Ultrazvučni pregled abdominalne šupljine, retroperitonealnog i pleuralnog prostora, probavnog sustava, te fascija oko lomova kostiju sa ciljem identifikacije „skrivenog“ krvarenja
Serijsko određivanje hematokrita (Htc) i ukupnih proteina (TTP), kako bi se procijenio stupanj aktualnog krvarenja
Upotreba viskoelastičnih testova sa ciljem identifikacije koagulopatije, zatim da bi se mogla predvidjeti potreba za transfuzijom, te za procjenu praćenja odgovora na terapiju. Ukoliko viskoelastični testovi nisu dostupni, transfuzija krvnih produkata održava PT i aPTT <1.5x srednjih fizioloških vrijednosti
Rezultate serijskih mjerenja BE i laktata, interpretirati u vezi sa srčanim otkucajima, kvalitetama pulsa, vremenu ponovnog kapilarnog punjenja, boji i vlažnosti sluznica, tjelesnom temperaturom, i arterijskim krvnim tlakom
U pacijenata sa nekontroliranim krvarenjem pogledati Tablicu 4 do postizanja hemostaze
Razmotriti upotrebu antifibrinolitika (traneksamske i aminokaprične kiseline) u slučajevima nekontroliranih, nekompresivnihkravarenja kada rezultati viskoelastičnih testova upućuju na hiperfibrinolizu. Preporuka za humanu medicinu govori da se antifirbinolitici apliciraju humanim traumatološkim pacijentima čim prije nakon traume, ali ne kasnije od 3h nakon traume.
Pacijentima koji primaju masivnu transfuziju, treba pratiti serumske vrijednosti ioniziranog kalcija i magnezija.

DISKUSIJA

Trauma (tupa ili penetrirajuća) može imati dva ishoda. Može biti uzrokom smrti uslijed golemih oštećenja odnosno kao posljedica komplikacija (krvarenja, disfunkcije više organa, infekcije ili sepse). Ishod traume također može biti preživljavanje i ozdravljenje. Inicijalni odgovor na traumu ima zaštitnu ulogu, no ukoliko odgovor bude obilan i rasprostranjen po čitavom organizmu razviti će se sustavni upalni odgovor. Pretraživanjem računalne baze podataka, u veterinarskoj bolnici Sveučilišta u Pennsylvaniji u razdoblju od 01. siječnja 1997 do 31. prosinca 2003, utvrđeno je 305 slučajeva pasa koji su pretrpjeli traumu a koji su bili pod stalnom intenzivnom njegom nakon početne stabilizacije (2). Većina pasa u analiziranim skupinama, koji su doživjeli tupu traumu, bili su mladi psi, srednjih pasmina i žrtve naleta motornih vozila. Najčešće zahvaćeno pojedinačno mjesto bila su prsa. U pacijenata koji dožive jaku tupu traumu mogu se, kao posljedica pretrpljene traume, očekivati višestruke ozljede. U vezi sa navedenim, u 72.3% ispitivane populacije je utvrđena politrauma, pri čemu su najčešće pogođena područja trbuh i prsa. Uobičajeni nalaz fizikalnog pregleda su tahikardija i tahipneja. Kod prijema najčešće su uočene blaga hiperglikemija, blaga hiperlaktatemija, blaga nekompenzirana metabolička acidoza, blaga hipoalbuminemija, blaga trombocitopenija te umjereno povećanje serumske alaninaminotransferaze (2).

Također uzrok traume može biti i prostrijel psa koji može uzrokovati teška oštećenja grudne i abdominalne šupljine (40).

Opsežna baza podataka omogućila je generiranje 67 opisa traume za razne ozljede i stečena stanja. Ozljede prsnog koša uključivale su plućne kontuzije (58% svih pacijenata), pneumotoraks (47%), hemotoraks (18%), prijelome rebara (14%), pneumomedijastinum (8%), dijafragmatsku herniju (6%), plućne *bullae* (2%), te otkazivanje pluća (2%). Klinička dijagnoza traume glave postavljena je u 25% svih pacijenata.

Klinički dokazi epistakse i lomova kosti lubanje, bili su prisutni u 11% svih pacijenata. Najučestalija abdominalna ozljeda bio je hemoperitoneum (23%), slijede ga trbušne kile (5%), pa ruptura mokraćnih puteva (3% svih slučajeva). Ozljede mekih tkiva u svih pacijenata uključuju površinske ogrebotine (56%), laceracije (26%), subkutani emfizem (10%), veći oguljene dijelovi (8%) te ostale manje uobičajene ozljede u 7% svih slučajeva. Ortopedske ozljede prednjih ekstremiteta uključuju frakturu lopatice (7%), luksaciju lakta (3%) te prijelom radijusa u 2% svih slučajeva. Ortopedske ozljede stražnjih ekstremiteta uključuju lomove zdjelice (kod 28% pacijenata), prijelome bedrene kosti (16%), luksacije kuka (12%) lomove distalnih dijelova ekstremiteta u 8% pacijenata. Aksijalne ortopedske ozljede uključuju prijelome kralježnice (10%), sakralne luksacije (9%), te sakralne prijelome u 3% unesrećenih. Stečeni uvijeti za sve pacijente uključuju ležanje pri prijemu (41%), aritmije (22%), hematuriju (12%), razvoj kašlja u 7% unesrećenih, regurgitaciju (6%), hematoceziju (5%), MODS (4%), razvoj upale pluća (4%), hemoptizu (4%), potreba za mehaničkom ventilacijom (4%), razvoj ARDS-a u 2% pacijenata, respiratorni zastoj u 2%, kardiopulmonalni zastoj (2%), melena (2%) i DIC u 2% unesrećenih (2). Rezultati pretraživanja početnog Htc (*hematokrit*) / UPP (*ukupni proteini plazme*) i Htc / TPP nakon tekućinske nadoknade, te plin u venskoj krvi, CBC (engl. *complete blood count*) i biokemija seruma analizirani su za sve pacijente. Testovi zgrušavanja, ispitivani u kliničkom laboratoriju, koji su obuhvaćali protrombinsko vrijeme (PT) i aktivirano parcijalno protrombinsko vrijeme (aPTT) ispitivani su na 53 pacijenta. Vrijednosti PT i aPTT testova bili su u referentnom intervalu u 79.2% i 52.8% pacijenata. Blago produljenje (25-50% više od kontrolne vrijednosti) PT i aPTT-a zabilježeno je u 13.2% i 30.2% slučajeva. Umjereno produženje (50-100% od kontrole) PT-a i aPTT-a zabilježeno je u 7.5% odnosno 13.2% unesrećenih. Vrijednost aPTT-a je bila >100% u odnosu na kontrolu u smo 2 pacijenta (3.8%). Medijan i srednje vrijednosti za Htc / UPP nakon tekućinske reanimacije, glukozu u krvi, bazni višak (BE), laktati, ukupni WBC (engl. *white blood cell count*), broj trombocita, aspartataminotransferaza i alaninaminotransferaza u svih 235 pacijenata su bile izvan referentnog intervala. Pedeset i pet posto pasa (113 / 206 preživjelih i 16 / 29 ne-preživjelih) upućeni su u bolnicu Sveučilišta u Pennsylvaniju od drugog veterinara, sa preostalih 45% pasa koji su nakon traumatske ozljede izravno došli na prijam u bolnicu. Svim pacijentima postavljen je intravenski kateter, a u 114 bolesnika primijenjen je početni tekućinski bolus. Kao jedino sredstvo tekućinske reanimacije upotrebljena je izotonična kristaloidna otopina u 55 od 114 pacijenata. Kombinacija koloida i 7.5% hipertonske fiziološke otopine aplicirana je u 14 pacijenata. Početna tekućinska reanimacija uključivala je također upotrebu Manitola (u 18 pacijenata), svježe smrznutu plazmu (12 pacijenata) te pRBC (kod 13 unesrećenih). U 39 pacijenata aplicirana je kombinacija više od jedne vrste tekućine. Volumen tekućinskog bolusa bio je promjenjiv budući je ovisio o pacijentovoj tjelesnoj masi i vrsti tekućine. Ukupno je 57 pacijenata, tijekom hospitalizacije, primilo pRBC transfuziju (prosječno 1.1U pRBC, a 1U predstavlja eritrocite dobivene od 450mL krvi). Infuziju FFP primilo je ukupno 66% pacijenata (prosjek 1.8U, a 1U je 120mL). Inicijalna analgezija aplicirana je u 199 pacijenata, od kojih je 162 pacijenata primilo opioidnu analgeziju. Terapija kisikom tijekom hospitalizacije (nosna sonda ili primjenom kisika u kavezu) provedena je u 119 pacijenata. Pneumotoraks je u 34 pacijenata bio indikacija za intubiranje. Mehanička ventilacija provedena je u 9 od 235 pacijenata, a razlozi ventilacije obuhvaćali su upalu pluća, ARDS ili plućnu kontuziju. Kompresijski omot oko trbuha postavljen je tijekom inicijalne stabilizacije u 12 od 53 bolesnika. Troje pacijenta sa teškim hemoperitoneumom zahtijevalo je kiruršku obradu (dvije totalne splenektomije i 1

lobektomija jetre). Vrsta kirurške intervencije zavisila je od nanesenih ozljeda, međutim 63.5% zahvata je bilo ortopetskih, dok je 36.5% zahvata obuhvaćalo meko tkivo. Prosječni broj dana od prijema do operativnog zahvata je 2.2. Ukupno prosječno vrijeme kirurških zahvata svim kirurškim pacijentima je 2.97 sati. Prosječno trajanje hospitalizacije bilo je 5.32 dana (± 3.07 dana) sa prosječno 2.98 dana (± 2.12 dana) provedenih na intenzivnom odjelu (ICU). Srčane aritmije najvjerojatnije su multifaktorijalnih uzroka osobito u politraumatskih pacijenata koji pate od raznih stanja kao što su torakalna trauma, hipoksemija i hipoperfuzija. Učestalost mogućih tupih srčanih ozljeda i posljedičnih srčanih aritmija, u istraživanju Simpson i sur., bila je 21.3% u prva 24 sata. Zanimljivo je da je u samo 3 od 53 teško ozlijeđenih pasa bio indiciran kirurški zahvat. U istraživanju Boysen i sur., niti jedan pas nije zahtijevao operaciju, pokazujući da se hemoperitoneumom, razvijenom sekundarno od tupe ozljede, može upravljati medicinski (40). Unatoč svojim ograničenjima, laktat i bazni deficit (BE) se i dalje koriste kao parametri praćenja skrbi te se koriste za usmjeravanje reanimacije. Moguće je dobivanje podataka o prognozi određivanjem laktata. U istraživanju Simpson i sur., pacijenti sa tupom traumom koji su zahtijevali intenzivnu skrb, imali su početnu srednju razinu laktata od 3.5 mmol/ L. Navedeni nalaz je u skladu sa deficitom perfuzije i vjerojatno je povećan uslijed ozbiljnosti ozljede. Literatura humanih trauma sugerira kašnjenje u klirensu laktata koja se povezuje sa većim rizikom od infekcije i smrtnošću (42). Trauma je česta pojava u veterinarskih pacijenata. Nažalost ne postoji nacionalna baza podataka za veterinarske pacijente, a sustavi bodovanja traume su ograničeni, za razliku od vrlo razvijenih sustava bodovanja boli (43). Upotreba veterinarske baze podataka za akutnu traumu omogućila bi razvoj točnog sustava bodovanja koji bi se mogao implementirati u identifikaciji pacijenta sa tupom traumom kod kojih postoji rizik za ranu smrtnost tijekom hospitalizacije. Za veterinarske pacijente, klinički sustav bodovanja traume omogućio bi identifikaciju životinja sa većim rizikom za smrt i komplikacije, usredotočenije liječenje i njegu kao i mogućnost pružanja prognostičkih informacija za našeg pacijenta. Uz navedeno, takvi sustavi bodovanja implementirani u ispitivanja bolesnika sa traumom pomažu rasvijetliti odnose oboljenje i smrtnosti odnosno omogućavaju učinkovitije liječenje kao i pristup pacijentu.

ZAKLJUČAK

Akutna traumatska koagulopatija javlja se neposredno nakon traume (<1h) te predstavlja endogeno stanje smanjenog zgrušavanja krvi. Fenotipski se ATC manifestira kao stanje smanjenog zgrušavanja krvi (hipokoagulacije) i hiperfibrinolize. Oštećenje endotela stanica, nakupljanje leukocita, te diseminirana intravaskularna koagulopatija vode do apoptoze i nekroze parenhimskih organa sa razvojem sindroma multiple organske disfunkcije (MODS) odnosno do zatajenja više organa (MOF). Psi koji su preživjeli inicijalnu traumu i zahtijevaju intenzivnu skrb, mogu imati dobru prognozu za potpuni oporavak nakon otpusta. Mogući uzroci smrtnosti nakon tupe traume psa su razvoj MODS-a, ARDS-a, DIC-a i infekcije. Psi sa detektiranom hiperlaktatemijom i hiperglikemijom, koji leže pri prijemu su u najvećem riziku. Razvoj točnih sustava bodovanja veterinarskih traumatoloških pacijenata omogućio bi ocjenjivanje traume, precizniji pristup kao i davanje prognoze. Provođenje inicijalnih biokemijskih i hematoloških ispitivanja, kao rutinska obrada, bilo bi korisno kod traumi veterinarskih pacijenata. Budući je razina laktata podložna djelovanju drugih čimbenika, potrebno je određivanje više faktora u svrhu što točnijeg bodovanja ozljeda veterinarskih pacijenata.

LITERATURA

1. *Padovan, (gl. urednik) (2006) Enciklopedijski rječnik humanog i veterinarskog medicinskog nazivlja, Zagreb. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti. Leksikografski zavod Miroslava Krleže*
2. *Simpson, S. A., R. Syring, C. M. Otto (2009) Severe blunt trauma indogs: 235 cases (1997- 2003). Journal od Veterinary Emergency and Critical Care.Pp 588- 602*
3. *Kauvar, D. S., R. Lefering, C. E. Wade. (2006) Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. J Trauma. 60(6 Suppl):S3–S11.*
4. *Maegele, M., H. Schochl, M.J. Cohen (2014) An up-date on the coagulopathy of trauma. Shock. 41:21–5.*
5. *Gando, S., A. Sawamura, M. Hayakawa. (2011) Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. Ann Surg. 254:10–19.*
6. *Brohi, K. (2009) Trauma induced coagulopathy. JR Army Med Corps.155:320–322.*
7. *Midwinter, M.J., T. Woolle (2011) Resuscitation and coagulation in the severely injured trauma patients. Phil Trans R Soc B. 366:192–203.*
8. *Palmer, L.,L. Martin (2014) Traumatic coagulopathy- Part 2: Resuscitative strategies. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 24(1).Pp 63–74 doi:10.1111/vec.12138.*
9. *Reece, W. O. (editor) (2015) Duke's Physiology of Domestic Animals, Thirteen Edition, Publishedby John Wiley & Sons. Inc. Chapter 12: the Composition and Functions of Blood.Pp 127- 132*
10. *Matić, D., D. Vnuk (2010): Šok i zaustavljanje krvarenja. In: Veterinarska kirurgija i anesteziologija. Medicinska naklada.Pp.193-208, 215- 218*
11. *Frith, D., K. Brohi (2010) The acute coagulopathyof trauma shock: clinical relevance. Surgeon. 8:159–163.*
12. *Brohi, K., M.J. Cohen, M.T. Ganter, M. A. Matthay, R.C. Mackersie, H.F. Pitter (2007) Acute traumatic coagulopathy: initiated by hypoperfusion – modulated through the protein C pathway. Ann Surg. 245:812–818*
13. *Frith, D., R. Davenport, K. Bronhi(2012) Acute traumatic coagulopathy. Curr Opin Anaesthesiol. 23 (2): 229-34*
14. *Johansson, P. I., A. M. Sørensen, A. Perner, K. L. Welling, M. Wanscher, C. F. Larsen, S. R. Ostrowski (2011) Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. Crit Care. 15:R272.*
15. *Johansson, P. I. , S. R. Ostrowski (2010) Acute coagulopathy of trauma: balancing progressive catecholamine induced endothelial activation and damage by fluid phase anticoagulation. Med Hypotheses. 75:564–567*
16. *Hess, J. R., K. Brohi, R. P. Dutton, C. J. Hauser, J. B. Holcomb, Y. Kluger, K. Mackway- Jones, N. J. Parr, S. B. Rizoli, T. Yukioka, D. B. Hoyt, B. Bouillon (2008) The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. J Trauma. 65:748–754.*
17. *Rotstein, O.D. (2003) Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/ resuscitation. J Trauma. 54(Suppl. 5):203—6.*
18. *Waydhas, C., D. Nast-Kolb, A. Trupka, R. Zettl, M. Kick, J. Weisholler, L. Schweiberer, M. Jochum (1996) Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. J Trauma. 40:624—30.*
19. *Rangel-Frausto, M.S., D. Pittet, M. Costigan, T. Hwang, C. S. Davis, R. P. Wenzel (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospecitve study. JAMA. 273:117-23.*
20. *Martin, C., C. Boisson, M. Haccoun, L. Thomachot, J. L. Mege (1997) Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis-a and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. Crit Care Med. 25:1813—9.*

21. *O'sullivan, S.T., J.A. Lederer, A.F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick, M. L. Rodrick (1995) Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. Ann Surg. 222:482—92*
22. *Botha, A.J., F. A. Moore, E. E. Moore, F. J. Kim, A. Banerjee, V. M. Peterson (1995) Postinjury neutrophil priming and activation: a nearly vulnerable window. Surgery. 118:358—65.*
23. *Rose, S., I. Marzi (1996) Pathophysiology of polytrauma. Zentralbl Chir. 121:896—913.*
24. *Giannoudis, P. V., F. Hildebrand, H. C. Pape (2004) Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. J Bone Joint Surg. (Br)86-B:313—23.*
25. *Neidhardt, R., M. Keel, U. Steckholzer, A. Safret, U. Ungethuem, O. Trentz, W. Ertel (1997) Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. J Trauma. 42:863—71.*
26. *Van Griensen, M., C. Krettek, H. C. Pape (2003) Immune reactions after trauma. Eur J Trauma. 29:181—92.*
27. *Smolec, O., I. Karaselimović, M. Kreszinger, N. Brkljača Bottegaro, R. Zobel, J. Kos (2012) . Stanični odgovor organizma na kiruršku traumu. Veterinarska stanica. 43, 1;77-80.*
28. *Bone, R. C., Sir Isaac Newton (1996) Sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med. 24:1125—8.*
29. *Kong, S. E., L. R. Blennerhassett, K. A . Heel, R. D. Mccauley, J. C. Hall (1998) Ischaemia—reperfusion injury to the intestine. Aust N Z J Surg. 68:554—61.*
30. *Taylor, JR, F. B., C. H. Toh, W. K. Hoots, H. Wada, M. Levi (2001) Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost. 86:1327–30.*
31. *Guillaumin, J. (2009) Disseminated intravascular coagulation. Emergency medicine &critical care.The Ohio State University.*
32. *Malone, D. L.,D. Kuhls, L. M. Napolitano, R. Mccarter, T. Scalea (2001) Back to basics: validation of the admission systemic inflammatory response syndrome score in predicting outcome in trauma. J Trauma. 51:458—63.*
33. *Lee, J. A. (2009) Disseminated intravsascular cogulation (DIC) in pets: A blood clotting disorder. Dog Disease & Conditions A- Z.*
34. *Lenz, A., G. A. Franklin, W. G. Cheadle (2007) Systemic inflammation after trauma. Injury. 38:1336–1345.*
35. *Smolec, O., P. Dornig, M. Pećin, B. Toholj, K. Ilijevska, M. Lipar (2019) Načela hemostaze u veterinarskoj kirurgiji. Hrvatski veterinarski vjesnik 27, (5-6), 38-43.*
36. *Geeraedts, JR L. M., H. A. Kaasjager, A. B. Van Vugt, J. P. Frölke (2009) Exsanguination in trauma: a review of diagnostics and treatment options. Injury. 40(1):11–20.*
37. *Rossaint, R.,B.Bouillon, V. Cerny, T. J. Coats, J. Duranteau, E. Fernández- Mondéjar, D. Filipescu, B. J. Hunt, R. Komadina, G. Nardi, E. A. Neugebauer, Y. Ozier, L. Riddez, A. Schultz, J. L. Vincent, D. R. Spahn (2010) Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. Crit Care. 14(2):R52. 1–29.*
38. *Croce, M. A., T. C. Fabian, P. G Menke, L. Waddle- Smith, G. Minard, K. A. Kudsk, J. H. JR Patton, M. J. Schurr, F. E. Pritchard (1995) Nonoperative management of blunt hepatic trauma is the treatment of choice for hemodynamically stable patients. Results of a prospective trial. Ann Surg. 221(6):744–753.*
39. *Smolec, O., M. Pita, F. Božić, J. Šuran, M. Lipar, M. Pećin, B. Toholj, E. Oster, N. Ivkić, P. Dmitrović (2019) Klinička primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova u pasa. Veterinarska stanica 50 (2), 155-165.*
40. *Capak, H., N. Brkljaca Bottegaro, A. Manojlović, O. Smolec, D. Vnuk (2016) Review of 166 Gunshot Injury Cases in Dogs. Topics in Companion Animal Medicine. 31, 4, 146-151*
41. *Boysen, S. R., E. A. Rozanski, A. S. Tidwell, J. L. Holm, S. P. Shaw, J. E. Rush (2004) Evaluation of a focused assessment with sonography for trauma protocol to detect free abdominal fluid in dogs involved in motor vehicle accidents. J Am Vet Med Assoc. 225 (8), 1198- 1204*

42. *Schulman, A. M., J. A. Claridge, G. Carr, D. L. Diensen, J. S. Young (2004) Predictors of patients who will develop prolonged occult hypoperfusion following blunt trauma. J Trauma. 57(4), 795–800.*
43. *Smolec, O., P. Uglešić, M. Pećin, B. Toholj, B. Radišić, M. Dobranić, K. Ilijevska, Ž. Milošević, A. Manojlović, M. Lipar (2021) Neurofiziologija boli u kirurških pacijenata.Veterinarska stanica 52,(2) , 209-221.*

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 2, No1, 2021
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 636.09
Štrbac et al., pp 49-59

IN VITRO OVICIDAL ACTIVITY OF MIXTURE OF LINALOOL AND ESTRAGOLE AGAINST GASTROINTESTINAL NEMATODES OF SHEEP

IN VITRO OVICIDNA AKTIVNOST SMEŠE LINALOOLA I ESTRAGOLA PROTIV GASTROINTESTINALNIH NEMATODA OVACA

Filip Štrbac[1], Antonio Bosco[2], Alessandra Amadesi[2], Laura Rinaldi[2], Giuseppe Mangieri, Dragica Stojanović[1], Nataša Simin[3], Dejan Orčić[3], Ivan Pušić[4], Slobodan Krnjajić[5], Radomir Ratajac[4]

[1]*Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Serbia*
[2]*Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Naples Federico II, CREMOPAR, Naples, Italy*
[3]*Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia*
[4]*Scientific Veterinary Institute Novi Sad, Novi Sad, Serbia*
[5]*Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Serbia*
**Corresponding author: strbac.filip@gmail.com*

ABSTRACT

Based on the results in different studies conducted so far, plant essential oils (EOs) are recently been marked as a possible solution for the problem of anthelmintic resistance (AR). However, their efficacy against a wide range of livestock parasites is due to active ingredients. In that context, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* ovicidal effect of a mixture of linalool and estragole (14% : 86%, respectively) against sheep gastrointestinal nematodes (GINs) using the egg hatch test (EHT). The study was conducted using faecal samples of naturally infected sheep by GINs from two different farms located in Southern Italy. Coproculture of tested faecal samples was performed, as well as chemical analyses of the tested mixture. The egg hatch test (EHT) was performed at six different concentrations (50, 12.5, 3.125, 0.781, 0.195 and 0.049 mg/mL) and the obtained values were compared to the positive control (thiabendazole, 0.025 mg/mL) and the negative control (3% Tween 80, v/v). The tested binary combination showed high and dose-dependent ovicidal activity varied from 29.5% to 100%. The inhibitory effect on egg hatchability was similar ($p>0.05$) to the positive control (98.0%) at concentrations of 50 mg/mL (100%), 12.5 mg/mL (100%) and 3.125 (99.8%). Moreover, all tested concentrations showed significantly higher ($p<0.001$) activity compared to the negative control. The obtained results suggest that the combination of linalool:estragole has the potential to be used against sheep GINs. These also highlight the possible role of different combinations of certain constituents of essential oils in combating AR. However, these findings need confirmation in further *in vivo* studies.

Key words: *in vitro*, plant essential oils, linalool, estragole, gastrointestinal nematodes,

anthelmitical resistance

SAŽETAK

Na osnovu rezultata do sada sprovedenih istraživanja, etarska ulja biljaka su označena kao jedna od mogućih opcija za rešenje problemarezistencije na antihelmintike. Pri tome, za njihovu efikasnost protiv različitih parazita domaćih životinja odgovorni su njihovi aktivni sastojci. U tom kontekstu, cilj ovog istraživanja je bio ispitati ovicidnu efikasnost smeše linaloola i estragola (14% i 86%, tim redom) protiv gastrointestinalnih nematoda (GIN) ovaca koristeći test izleganja jaja (egg hatch test (EHT)). U studiji su korišćeni uzorci fecesa ovaca prirodno inficiranih GIN sa dve različite farme u južnoj Italiji. Koprokultura testiranih uzoraka je sprovedena, kao i hemijske analize testirane smeše. EHT je sproveden za šest različitih koncentracija (50; 12,5; 3,125; 0,781; 0,195 i 0,049 mg/mL), pri čemu su dobijeni rezultati upoređeni sa pozitivnom (tiabendazol, 0.025 mg/mL) i negativnom (3% Tween 80) kontrolom. Testirana binarna kombinacija je pokazala snažnu, dozno-zavisnu ovicidnu aktivnost koja je varirala između 29,5% i 100%. Inhibitorni efekat na izleganje larvi je bio sličan (p<0,05) pozitivnoj kontroli (98,0%) pri koncentracijama od 50 mg/mL (100%), 12,5 mg/mL (100%) i 3,125 mg/mL (99,8%). Pri tome, kod svih testiranih koncentracija efekat je bio značajno veći (p<0,001) u poređenju sa negativnom kontrolom. Dobijeni rezultati ukazuju na to da ispitana smeša linaloola i estragola ima potencijal da se koristi protiv GIN ovaca. Takođe, ova studija ukazuje na moguću ulogu različitih sastojaka biljnih etarskih ulja u borbi protivrezistencije na antihelmintike. Međutim, ovi nalazi zahtevaju dodatnu potvrdu u budućim in vivo ispitivanjima.

Ključne reči: in vitro, etarska ulja biljaka, linalool,estragol, gastrointestinalne nematode, rezistencija na antihelmintike

INTRODUCTION

The intensive use of anthelmintics in the past few decades, for the control of various nematode infections in livestock, has resulted in the development of anthelmintic resistance (AR) (1,2). This is especially pronounced in sheep gastrointestinal nematodes (GINs), which are associated with low body development, decrease in production and reproductive indexes and increase in mortality in the sheep flocks (3). Unfortunately, various single- and multiple-drug resistant species of these parasites are already common throughout the world (1). The increased resistance led to reduced efficacy of most commonly used anthelmintics, such as benzimidazoles and macrocyclic lactones (3), consequently causing major economic losses (4). For these reasons, infections caused by GINs became nowadays a major concern and obstacle facing sheep farmers around the world (3,5).

The worldwide increased difficulty to control GIN infection in sheep, as well other nematode infections in livestock, requires devising new strategies and alternative approaches. These include the use of medicinal plants and their products known as plant secondary metabolites (PSM) with anthelmintic activity (5). Among them are essential oils (EOs) - aromatic, concentrated and complex mixtures of volatile nonpolar compounds extracted from plant material (6). These plant products were already shown a wide range of medicinal properties such as antibacterial, antifungal, antiparasitic, anti-inflammatory and antiseptic effect, therefore increasing interest in their use in veterinary medicine (7,8). Furthermore, some EOs have already shown anthelmintic potential against GINs of sheep, which include EOs of *Mentha piperita* (9), *Thymus vulgaris* (10), *Lavandula officinalis* (4), *Rosmarinus officinalis* (11), *Eucalyptus citriodora* (12), *Juniperus communis* (13), *Achillea millefolium* (14) and some others (15).

The anthelmintic effect of EOs is related to their chemical composition, i.e. presence of many bioactive compounds (16). Therefore, some studies examined and demonstrated the anthelmintic potential of isolated compounds from essential oils. That includes cinnamaldehyde, anethole, carvone, carvacrol, thymol, eugenol, vanillin and linalool and others (17, 18, 19, 20). In some cases, the anthelmintic activity of their binary, ternary and quaternary combinations against sheep GINs was also evaluated, whereby it was demonstrated that some of these components are showing synergic properties and higher activity when formulated in combination (17). For some of these combinations, it was concluded that they represent promising formulations for sustainable parasite control based on the activity they showed. For example, cinnamaldehyde:carvone was tested *in vitro* (17) and anethole:carvone was tested both *in vitro* and *in vivo* (17,21), whereby their high anthelmintic potential was demonstrated.

Linalool ($C_{10}H_{18}O$) is a monoterpene alcohol widely present as a major constituent of plant EOs with extensive use. Linalool *per se* is considered non-toxic for mammals, and its comprehensive range of bioactive properties was demonstrated in many studies so far. That refers to its anti-inflammatory, anticancer, anti-hyperlipidemic, antimicrobial, antiparasitic, analgesic and neuroprotective effects besides all (22). On the other hand, estragole (methyl chavicol, $C_{10}H_{12}O$) is a relatively non-toxic volatile ether which is an isomer of anethole. Estragole is also an important constituent of many EOs with widespread application in folk medicine and aromatherapy mostly for antimicrobial, antiparasitic, antispasmodic, immunostimulant and local anesthetic properties (23,24). Since both compounds expressed antiparasitic effects individually, it was assumed that the mixture of these compounds could have even stronger anthelmintic properties, which can be likely attributed to their synergism.

A combination of linalool and estragole in a similar ratio used in the present study was found in some chemotypes of basil EO (*Ocimum basilicum* L.), mostly with other compounds present in smaller percentages (25,26,27). However, it is important to note that the chemical composition of basil EO may vary depending on various endogenous and exogenous factors. It may contain monoterpenes derivates (linalool, camphor, limonene, 1,8-cineole, geraniol) and phenylpropanoid derivates (chavicol, methyl chavicol - estragole, eugenol, methyl eugenol, methyl-cinnamate). Nevertheless, basil is a plant very famous for its many therapeutic properties and it has long been used for curing a lot of diseases and conditions such as strong aching, pyrexia, headaches, coughs, acne, diarrhea, constipation, kidney malfunction, infective diseases and worm diseases as well (25). In addition, antimicrobial activities against *E. coli* and *S. aureus*, as well antiparasitic against L_3 of *Aedes aegypti* for mentioned chemotypes that contain a similar ratio of linalool and estragole were scientifically validated (26,27).

The aim of this study was to evaluate the anthelmintic potential of binary combination linalool:estragole, against GINs of sheep.

MATERIAL AND METHODS

Sample – the binary mixture

A mixture of linalool:estragole was obtained from the producer "Alekpharm", Belgrade, Serbia. Confirmation of the presence of these compounds and determination of their ratio in the mixture was done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses (13,14), which is widely used in plant essential oil compounds identification. The chemical analyses were performed at the Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia.

Obtaining eggs and the egg hatch test

The whole *in vitro* procedure was performed at the Regional Center for Parasitic Diseases (CREMOPAR), located in Eboli (Salerno Province, Campania Region), Italy. *In vitro* ovicidal potential of the tested synergistic combination was evaluated by using the egg hatch test (EHT), which is commonly used to test the efficacy of antiparasitic drugs and the detection of parasitic resistance. Faecal samples of sheep with natural mixed infection from two different farms in southern Italy were collected directly from the rectal ampulla, whereby samples were processed within 2h of collection using the recovery technique with some modification (30). Firstly, faecal samples were homogenized and filtered under running water through four sieves of different mesh sizes (1 mm, 250 µm, 212 µm and 38 µm) to separate the eggs from the faeces. Next, the GIN eggs retained on the last sieve were washed and centrifuged for 3 min at 1500 relative centrifugal force with distilled water, after which the supernatant was discarded. In the end, centrifugation was performed using a 40% sugar solution to float the eggs which are then isolated in new tubes, mixed with distilled water and then centrifuged two more times to remove pellets. In this way, an aqueous solution with eggs necessary for the egg hatch test was obtained.

The EHT was performed with different concentrations used as proposed by Ferreira et al. (2018) with some modification (4). 24-well plates, containing aqueous solutions of approximately 150 eggs/well, were used for this experiment. Six different concentrations of binary combination of linalool:estragole (50, 12.5, 3.125, 0.781, 0,195 and 0.049 mg/mL) were emulsified in Tween 80 (3%, v/v) and completed with distilled water in a final volume of 0.5 mL/well. After an incubation of 48h at 27°C, the number of eggs and first-stage (L_1) larvae were counted under an inverted microscope and the results were expressed as the mean percentage of egg hatching for each concentration. The obtained values were compared to the positive control (thiabendazole, 0.025 mg/mL), and the negative control (3% Tween 80, v/v).

Coproculture

To determine the genera of GINs *in vitro* tested on the efficacy of linalool:estragole binary combination, a pooled faecal culture for each farm was performed at CREMOPAR center following the protocol described by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (28). Developed third-stage larvae (L_3) were identified using the morphological keys proposed by the used literature (29). Identification and percentages of each nematode genera were conducted on 100 L_3.

Statistical analysis

The mean percentage of egg hatching was calculated using the following formula (31):

IH (%) = Number of eggs / (number of eggs + number of larvae (L_1)) x 100

Data on the inhibition of hatchability (IH) was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p<0.05$) to compare values obtained for different concentrations with each other and with controls (+ and -) (31). Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by nonlinear regression (4). All statistical procedures were performed by using the program GraphPad Prism 8.3.2.

RESULTS

Chemical analyses

The results of GC-MS analyses confirmed the presence of linalool and estragole (methyl chavicol) in the tested sample and their ratio was 14:86, respectively.

Egg hatch test

The results of the conducted EHT showed high activity of linalool:estragole combination against GIN eggs. The inhibitory effect on egg hatchability varied from 29.5% to 100% (table 1) and the effect was dose-dependent (R^2= 0,9528). All tested concentrations showed significantly higher activity ($p<0.001$) compared to the negative control and, for the three highest concentrations, the effect was high and similar to that of thiabendazole ($p>0.05$). Calculated half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was 0.9804 mg/mL.

Table 1. Efficacy percentage (mean ± standard deviation) of linalool:estragole binary combination on egg hatching of sheep gastrointestinal nematodes

Concentration (mg/mL)	**Inhibition of hatchability (%)**
50	100 ± 0^a
12.5	100 ± 0^a
3.125	99.8 ± 0.5^a
0.781	47.0 ± 20.45^b
0.195	29.5 ± 1.29^b
0.049	29.5 ± 2.65^b
Thiabendazole, 0.025 mg/mL	98.0 ± 0.82^a
3% Tween 80 (v/v)	16.8 ± 5.56^c

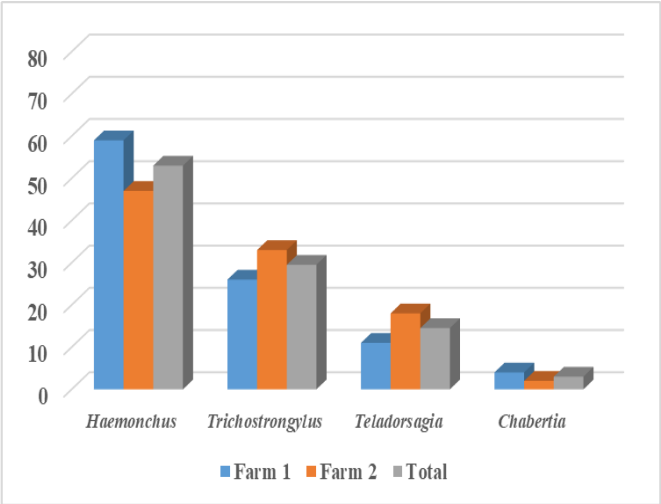
**Values with different lowercase letters indicate significant differences (p<0.05)*

Coproculture

In both examined farms, the coproculture identified the presence of four GIN genera: *Haemonchus* (53%), *Trichostrongylus* (29.5%), *Teladorsagia* (14.5%) and *Chabertia* (3%).

Results of the coproculture on each farm are shown in graph 1.

Graph 1. Percentage (%) of presented sheep genera on each tested farm



DISCUSSION

Recently, it was estimated that infections caused by GINs nowadays cost the European sheep industry hundreds of million € (32). However, it is difficult to assess the exact losses because these parasites can cause them in different ways. Therefore, due to the costs of anthelmintic-resistant nematode infections, there is a wide consensus on the need to enhance and implement early detection of AR, which includes the use of appropriate *in vitro* and *in vivo* methods (33). These methods are also widely used for testing the efficacy of different anthelmintic agents. In that context, *in vitro* tests are suitable for an initial evaluation and for the selection of compounds that have anthelmintic activity (19,34). Moreover, their advantages such as ease of application, low cost, speed, high reproducibility and lack of experimental animals make these tests widely used in the screening of medicinal plants (10). Among them, one of the most commonly used tests for evaluating the anthelmintic potential of EOs and their compounds is the EHT (4,9,10,11,12,13,14,17), whereby this test is considered accurate and reliable for this purpose. Therefore, EHT is important in the first step of the development of a new anthelmintic agent, after which different *in vivo* and toxicity tests may be conducted.

As a result of AR, as well as the public health concern due to the use of chemical therapeutics in livestock, there is a growing interest in alternative strategies for treating GINs. Within that context, many researchers agree that bioactive constituents produced by medicinal herbs to control GINs are a promising alternative to conventional anthelmintic drugs (35). In the present study, a binary combination of linalool:estragole showed high, dose-dependent ovicidal potential against ovine gastrointestinal nematode eggs. Namely, for the three highest concentrations (3.125-50 mg/mL) of the tested mixture, inhibition of egg hatchability was in the range of 99.75-100%, i. e. expressed the same activity as an effective anthelmintic. According to the criteria set up by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.), developed for the evaluation of different anthelmintic agents tested *in vitro*, these activities are considered highly effective (10,34) Although the rest three concentrations showed lower activity, the effect was still significantly higher than negative control suggesting that the mixture of linalool and estragole exhibit the anthelmintic potential even at very small doses. Furthermore, the results of this study are also important because anthelmintic activity was shown against important nematode genera such as *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* and.

According to the knowledge of the authors of the present study, there are no literature data about examining the anthelmintic potential of linalool:estragole binary combination and this is the first evaluation. Katiki et al. (2017) evaluated the ovicidal activity of isolated linalool against *Haemonchus contortus* eggs, where it showed a high inhibition of hatchability with IC_{50} of 0.29 mg/mL (17). In the study of Helal et al. (2020), the tested nematode species were similar as in the present study and pure linalool expressed a significant inhibitory activity against the motility of L_3 of sheep GINs at the highest concentrations tested for all examined species (*H. contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus vitrinus*) except *Cooperia oncophora*, and also induced considerable structural damage to larvas (36). For isolated estragole, there are no data about the anthelmintic activity. However, linalool and estragole are common ingredients of *Ocimum basilicum* EO and often the two most represented compounds of this EO. The recent research showed that EOs from different *Ocimum basilicum* cultivars exhibited a significant effect on egg-hatch inhibition of *H. contortus* with a mean IC_{50} varying from 0.56-2.22 mg/mL. Interestingly, the cultivar constituted mainly of linalool and methyl chavicol (estragole) was the cultivar with the highest egg-hatching inhibition, thus showing

its high anthelmintic potential (37). Based on this and other results, linalool:estragole combination was chosen for the evaluation of its ovicidal effects against sheep GINs in the present study.

Furthermore, in another study, our research team also evaluated the *in vivo* activity of this combination (same ratio of compounds) using the faecal egg count reduction test (FECRT) (38). The combination was perorally administrated to the sheep at the single dose of 100 mg/kg, whereby it reduced the number of counted nematode eggs by 24.91% and 25.90% at flock level on Days 7 and 14 after treatment, respectively. Individually observed, linalool:estragole combination average reduced FEC for 51.88% (Day 7 after treatment). Moreover, no side and toxic effects were observed on the animals after the administration of the tested combination. The results of this and the present study suggest the potential use of linalool:estragole combination in the future management of GINs infections as a valuable additional mean, in order to reduce the use of commercial anthelmintic and slowing development of anthelmintic resistance.

Linalool and estragole and their derivates were also important compounds in other EOs with proven anthelmintic activity against sheep GINs. Thus, linalool-acetate, an acetate ester of linalool, was a major compound of *Lavandula officinalis* EO (35.97%), which showed high ovicidal (IC_{50} = 0.316 mg/mL) and larvicidal (IC_{50} = 0.280 mg/mL) activity against *H. contortus* (4). Linalool *per se* was a major component of *Arisaema franchetianum* EO that was also exhibited ovicidal and larvicidal activity also against *H. contortus* with IC_{50} values of 1.63 mg/mL and 1.10 mg/mL, respectively (39). However, in that study isolated linalool did not show high activity in every assay and this result suggests that linalool is probably more effective in the presence of other bioactive ingredients due to synergism. On the other hand, estragole was one of the major components in both tested samples of *Croton zehntneri* EO (14.95% and 21.84%) which showed high anthelmintic potential with IC_{50} values in the EHT of 0.55 and 0.74 mg/mL, respectively (20).

The exact mode of action and high anthelmintic efficacy of different EOs is still not fully understood. It was suggested that bioactive ingredients of the EOs penetrate the cuticle of the nematodes by transcuticular diffusion, altering the mechanisms of locomotion and causing cuticular lesions (15). Other reports suggested the involvement of EOs components in interrupting the nematode nervous system (40) and/or in inhibition of AChE activity (41,42). Furthermore, bioactive compounds may disrupt the cell membrane of the nematode and change its permeability (40). On the other hand, high ovicidal activities shown in the EHT suggested abilities of EO compounds to penetrate the gelatinous matrix and act on nematode eggs. It is important to note that knowing and understanding the mode of action of the EOs and their bioactive ingredients are of practical importance for nematode control because it may give useful information on the most appropriate formulation and delivery means (43). For comparison, benzimidazoles selectively bind with high affinity to parasite β-tubulin and inhibit microtubule polymerization. This lead to the destruction of cell structure and consequent death of the parasite (44)

Although all compounds may be important for the biological properties of EOs, their efficacy mostly comes from their main ingredient or a few of them and their synergism (15,16). That fact offers a possibility for a use of binary, ternary and quaternary combinations of main components of the same or different EOs in an attempt to find the most active combination for control of nematodes (17). There is a large number of EOs bioactive constituents and a practically unlimited number of their combinations, so it is important to find the most suitable ones for the development of formulations. Besides high efficacy against parasites, those combinations should have low toxicity for hosts and small residues in meat and milk. Moreover, it is considered that in comparison to commercial drugs, these natural formulations would have higher environmental acceptability and lower

susceptibility to anthelmintic resistance (4,45). Therefore, the use of plant-based formulations as medicine offers an attractive alternative for controlling livestock parasites and combating anthelmintic resistance.

CONCLUSION

Plant EOs are valuable natural sources that can play a significant role in combating AR, which is especially important in the case of sheep GINs. The results of the present study showed that a mixture of two constituents of EOs – estragole and linalool - may also greatly affect these parasites, thus it represents a good basis for the development of new formulations for the prevention and treatment of infections caused by nematodes. That may highly increase the possibility to find valuable means for controlling livestock parasites.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was part of the STSM (Short Term Scientific Mission) titled “The methodology of the diagnostics of parasitic infections and methods for evaluating the efficacy of antiparasitic drugs” of COST Action COMBAR (Combatting Anthelmintic Resistance in Ruminants), number CA16230. Special thanks to the STSM Coordinator Maria Martinez-Valladares, who approved this STSM; to the Grant Holder Smaragda Sotiraki, who approved the financial support from the COST network for this STSM; and to Johannes Charlier, MC Chair. We also deeply thank Mario Parrilla for the tehnical support in the laboratory.

LITERATURE

1. Dolinská M., Ivanišinová O., Königová A., Várady M. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. BMC Veterinary Research 2014, 10:233.

2. Kaplan R.M. Biology, epidemiology, diagnosis and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice 2020, 36(1):17-30.

3. Ramos F., Portella L.P.,Rodrigues F.D.S., Reginato C.Z., Cezar A.S., Sangioni L.A., Vogel F.S.F. Anthelminthic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 2018, 38(1):48-52.

4. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., Contini S.H.T., França S.C, Chagas A.C.S., Beleboni R.O. Essential oils of Citrus aurantifola, Anthemis nobile and Lavandula officinalis: in vitro anthelmintic activities against Haemonchus contortus. Parasites & Vectors 2018, 11:269.

5. Chagas A.C.S., Figuerido A.., Politi F.A.S., Moro I.J., Esteves S.N., Bizzo H.R., Gama P.E., Chaves F.C.M. Efficacy of essential oils from plants cultivated in Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes of sheep. Journal of Parasitic Diseases 2018, 42(3):357-364.

6. Fayaz M.R., Abbas Z.R., Abbas A., Khan M.K., Raza M.A., Israr M., Khan J.A., Mahmood M.S., Saleemi M.K., Rehman T., Zaman M.A., Sindhu Z.D. Potential of botanical driven essential oils against Haemonchus contortus in small ruminants. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2019, 18(6):533-543.

7. Ebani V.V., Mancianti F. Use of essential oils in veterinary medicine to combat bacterial and fungal infections. Veterinary Sciences 2020, 7(4):193.

8. Vučinić M., Nedeljković-Trailović J., Trailović S., Ivanović S., Milovanović M., Krnjajić D. Mogućnost primene etarskih ulja u veterinarskoj medicini s posebnim osvrtom na etarsko ulje origana. Veterinarski Glasnik 2012, 66(5-6):407-416.

9. Katiki L.M., Chagas A.C.S., Bizzo H.R., Ferreira J.F.S., Amarante A.F.T. Anthelmintic activity of Cymbopogon martinii, Cymbopogon schoenanthus and Mentha piperita essential oils evaluated in four different in vitro tests. Veterinary Parasitology 2011, 183(1-2):103-108.

10. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S., Beleboni R.O. Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. Veterinary Parasitology 2016, 228:70-76.

11. 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. Ovicidal and larvicidal potential of Rosmarinus officinalis to control gastrointestinal nematodes of sheep. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 2019, 28(4):807-811.

12. Araújo-Filho J.V., Ribeiro W.L.C., André W.P.P., Cavalcante G.S., Rios T.T., Schwinden G.M., Rocha L.O.D., Macedo I.T.F., Morais S.M., Bevilaqua C.M.L., Oliveira L.M.B. Anthelmintic activity of Eucalyptus citriodora essential oil and its major component, citronellal, on sheep gastrointestinal nematodes. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 2019, 28(4):644-651.

13. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Ratajac R. In vitro ovicidal effect of common juniper (Juniperus communis L.) essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. Veterinary Review 2020, 1(1):152-159.

14. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Ratajac R. In vitro ovicidal activity of two chemotypes of yarrow (Achillea millefolium L.) essential oil against ovine gastrointestinal nematode eggs. Archives of Veterinary Medicine 2020, 13(2):59-76.

15. 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. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. Acta Scientiae Veterinarie 2018, 46:1522.

16. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. Essential oils` chemical characterization and

investigation of some biological activities: a critical review. Medicines 2016, 3(4):25.
17. Katiki L.M., Barbieri A.M.E., Araujo R.C., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S., Synergistic interaction of ten essential oils against Haemonchus contortus in vitro. Veterinary Parasitolology 2017, 243:47-51.
18. 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. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. Veterinary Parasitology 2016, 218:52-58.
19. 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. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 2017, 26(3):323-330.
20. Camurca-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais 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. Anthelmintic activity of Croton zehntneri and Lippia sidoides essential oils. Veterinary Parasitology 2007, 148:288-294.
21. Katiki L.M., Araujo R.C., Ziegelmeyera L., Gomesa A.C.P., Gutmanisa G., Rodriguesa L., Buenoa M.S., Veríssimoa C.J., Louvandinic H.,Ferreirad J.F.S.,Amarantee A.F.T. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with Haemonchus contortus. Experimental Parasitology 2019, 197:36-42.
22. Pereira I., Severino P., Santos A.C., Silva A.M., Souto E.B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018, 171:566-578.
23. Leal-Cardoso J.H., Matos-Brito B.G., Lopes-Junior J.E.G., Viana-Cardoso K.V., Sampaio-Freitas A.B., Brasil R.O., Coelho-de-Souzaand A.N., Albuquerqu A.A.C. Effects of estragole on the compoundaction potential of the rat sciatic nerve. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2004, 37(8):1193-1198
24. Oliveira C.B.S., Meurer Y.S.R., Medeiros T.L., Pohlit A.M., Silva M.V., Mineo T.W.P., Andrade-Neto V.F. Anti-toxoplasma activity of estragole and thymol in murine models of congenital and noncongenital toxoplasmosis. Journal of Parasitology 2016, 102(3):369-376.
25. Poonkodi K. Chemical composition of essential oil of Ocimum basilicum L. (basil) and its biological activities - an overview. Journal of Critical Reviews 2016, 3(3):56-62.
26. Sastry K.P., Kumar R.R., Kumar A.N., Sneha G., Elizabeth M. Morpho-chemical description and antimicrobial activity of different ocimum species. Journal of Plant Development 2012, 19:53-64
27. Nour AH, Nour AH, Yusoff MM, Jessinta S. Bioactive compounds from basil (Ocimum basilicum) essential oils with larvicidal activity against aedes aegypti larvae. 3rd International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE, Bangkok, Thailand, 2012.
28. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), Grande-Bretagne. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. H.M. Stationery Off, London, UK, 1986.
29. van Wyk J.A., Mayhew E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research 2013, 80(1):E1-E14.
30. Bosco A., Maurelli M.P., Ianniello D., Morgoglione M.E., Amadesi A., Coles G.C., Cringoli G., Rinaldi L. The recovery of added nematode eggs from horse and sheep faeces by three methods. BMC Veterinary Research 2018, 14(1):7.
31. Macedo I.T.F, de Oliveira L.M.B., Andre W.B.P., Filho J.V.A., dos Santos J.M.L., Rondon F.C.M., Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., de Oliveira E.F., de Paula H.C.B., Bevilaqua C.M.L. Anthelmintic effect of Cymbopogon citratus essential oil and its nanoemulsion on sheep gastrointestinal nematodes. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 2019, 28(3):522-527.
32. Mavrot F., Hertzberg H., Torgerson P. 2016. First assessment of production losses due to nematode infection in European dairy cattle and meat sheep. In: Mavrot F. Livestock nematode infection in a changing world: investigating the European situation. University of Zurich, Vetsuisse

Faculty, p. 70-130.
33. Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Iannielo D., Maurelli M.P., Cringoli G., Rinaldi L. The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. Parasites & Vectors 2020, 13(1):457.
34. Fonseca Z.A.A.S., Coelho W.A.C., Andre W.P.P., Bessa E.N., Ribeiro W.L.C., Perreira J.S., Ahid S.M.M. Use of herbal medicines in control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: efficacies and prospects. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal 7(2):233-249.
35. Zeineldin M., Abdelmegeid M., Barakat R., Ghanem M. A Review: Herbal Medicine as an Effective Therapeutic Approach for Treating Digestive Disorders in Small Ruminants. Alexandria Journal of Veterinary Sciences 2018, 56(1):33-44.
36. Helal M.A., Abdel-Gawad A.M., Kandil O.M., Khalifa M.M.E., Cave G.W.V., Morisson A.A., Bartley D.J., Elsheikha H.M. Nematocidal Effects of a coriander essential oil and five pure principles on the infective larvae of major ovine gastrointestinal nematodes in vitro. Pathogens 2020, 9:740.
37. Sousa A.I.P., Silva C.R., Costa-Júnior H.N., Silva N.C.S., Pinto J.A.O., Blank A.F., Soares A.M.S., Costa-Júnior L.M. Essential oils from Ocimum basilicum cultivars: analysis of their composition and determination of the effect of the major compounds on Haemonchus contortus eggs. Journal of Helminthology 2021, 95:e17.
38. Štrbac F., Bosco A., Rinaldi L., Amadesi A., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Ratajac R. 2021. In vivo potential of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and synergistic combination of linalool:estragole to control sheep gastrointestinal nematodes. Proceedings of 28th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Dublin, Republic of Ireland, 19-22 July, 2021, pp 517.
39. Zhu L., Dai J., Yang L., Qui J. Anthelmintic activity of Arisaema franchetianum and Arisaema lobatum essential oils against Haemonchus contortus. Journal of Ethnopharmacology 2013, 148(1):311-316.
40. Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z., Spiegel Y. Nematicidal activity of EOs andtheir components against the root-knot nematode. Phytopathology 2000, 90:710–715.
41. Lee S.E., Lee B.H., Choi W.S. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil. Pest Management Science 2001, 57:548–553.
42. Priestley C.M., Williamson E.M., Wafford K.A., Sattelle D.B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positiveallosteric modulator of human $GABA_A$ receptors and ahomooligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster. British Journal of Pharmacology 2003, 140:1363–1372.
43. Andres M.F., González-Coloma A., Sanz J., Burillo J., Sotomayor P.S. Nematicidal activity of essential oils: a review. Phytochemistry Reviews 2012, 11(4):371-390.
44. Abongwa M., Martin R.J., Robertson A.P. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. Acta Veterinaria (Beograd) 2017, 67(2):137-152.
45. Demeler J., Gill J.H., Himmelstjerna G.V.S., Sangster N.C. The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2013, 3:109–118.

VETERINARSKI PREGLED / VETERINARY REVIEW, Vol 1, No1, 2020
ISSN: 2683-5932; ISSN(Online): 2683-5924; UDK 569.723
Todorović et al., pp 60-65

UTICAJ APLIKACIJE SELENA (PROMTSELEN®) U PREPARTALNOM PERIODU NA POJAVU ZAOSTAJANJA POSTELJICE KOD PRVOTELKI

EFFECT OF SELENIUM APPLICATION (PROMTSELEN®) IN THE PREPARTAL PERIOD ON THE OCCURRENCE OF PLACENTAL RETENTION IN HEIFERS

Srđan Todorović[a]*, Zoran Ružić[a], Miodrag Radinović[a], Zdenko Kanački[a], Jovan Stanojević[a], Ivan Galić[a]

[a]*Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija*
[a]*University of Novi Sad, Faculty of Novi Sad, Department of veterinary medicine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija*
**Autor za kontakt:* srdjan.todorovic28@gmail.com

SAŽETAK

U radu su prikazani rezultati istraživanja uticaja preparata Promtselen® aplikovanog tri nedelje pred očekivan partus na pojavu zaostajanja postejice (ZP) kod prvotelki, kao i uspeh ovog tretmana u prevenciji zaostajanja posteljice. Ispitivanje je izvršeno na ukupno 140 visoko steonih junica Holštajn-frizijske rase, starosti 22 do 25 meseci, optimalne telesne kondicije, podeljenih u dve grupe, kontrolnu i oglednu po 70 junica. Samo oglednoj grupi je aplikovano 30 ml Promtselena® tri nedelje pred očekivano teljenje, a kontrolnoj grupi nije. Pojava zaostale posteljice kod prvotelki kontrolne grupe je dijagnostikovana u 25,71% slučajeva (18/70). U oglednoj grupi zaostala posteljica je dijagnostikovana u 8,57% slučajeva (6/70). Rezultati ovog rada se podudaraju sa brojnim rezulatima iz literature o pozitivnoj korelaciji suplementacije selena i vitamina E na uspeh izbacivanja posteljice kod prvotelki. Može se zaključiti da tretman prvotelki jednokratnom i/m injekcijom 30 ml preparata Promtselen® smanjuje pojavu zaostajanja posteljice nakon partusa i da aplikacija ovog preparata predstavlja uspešan faktor u prevenciji zaostajanja posteljice kod prvotelki.

Ključne reči: prvotelke, zaostala posteljica, Promtselen®, prevencija.

ABSTRACT

This paper presents the results of a study of the effect of Promtselen® applied three weeks before the expected partus on the occurrence of placental retention in heifers, as well as the success of this treatment in the prevention of placental retention. The study was performed on a total of 140 pregnant Holstein-Friesian heifers, 22 to 25 months of age, optimal body condition, divided into two groups of 70 heifers. Occurrence of the retained placenta in the control group was diagnosed in 25.71% of cases (18/70). In the experimental group, the retained placenta was diagnosed in 8.57% of cases (6/70). The results of this paper are consistent with numerous results from the literature on the positive correlation of selenium and vitamin E supplementation on the success of placental ejection in heifers. It can be concluded that the treatment of heifers with a single i/m injection of 30 ml of Promtselen® preparation reduces the occurrence of placental retardation after partus and that the application of this preparation is a successful factor in the prevention of placental retention in heifers.

Key words: heifers, retained placenta, Promtselen®, prevention.

UVOD

Zaostajanje posteljice (*lat. Retentio secundinarum*) kod goveda može dovesti do značajnih zdravstvenih poremećaja koji utiču na buduće reproduktivne performanse. U literaturi se ovaj poremećaj definiše kao stanje kada plodovi omotači ostaju u materici nakon telenja duže od 24 časa. Različiti autori navode različite podatke o vremenu zadržavanja posteljice unutar materice nakon porođaja, podaci se kreću u rasponu od 8 do 48 časova, ipak većina studija definiše vreme od 12 do 24 časa. Većina goveda (66%) izbaci posteljicu u roku od 6 časova nakon porođaja (1,2).

Uzroci nastanka zaostale posteljice su multifaktorijalni, odnosno postoji niz faktora rizika povezanih sa zaostajanjem posteljice, uključujući indukovan porođaj, skraćenu gestaciju, pobačaj, blizanački graviditet, teško teljenje, carski rez, nutritivni deficiti vitamina E, selena i karotena, zatim infektivni uzročnici poput virusa goveđe virusne dijareje, i imunosupresija (1). Rooh i saradnici (3) navode da incidenca ovog poremećaja varira od 4,0 do 16,1%.

Kao značajan faktor u nastanku zaostale posteljice navode se već pomenuti deficiti selena i vitamina E koji predstavljaju glavne antioksidanse. Selen je prirodni antioksidans, koji reguliše različite fiziološke procese u organizmu. Mehanizam delovanja je takav da je on sastavni deo selenoenzima glutation peroksidaze (GSH-Px), i na taj način deluje u oksidativnoj zaštiti ćelija (4). Selen ispoljava imunomodulatorni efekat, povećava funkciju neutrofila, migraciju i njihovu hemotaksičnu aktivnost. Takođe, utvrđeno je da odsustvo leukocita u placenti dovodi do zadržavanja posteljice kod 100% mlečnih krava (4). Kao posledica oksidativnog oštećenja nastaje toksin malondialdehid (MDA) koji nastaje neenzimskim cepanjem lipidnih hidroperoksida, koji može dovesti do citotoksičnosti i mutagenosti. Koncentracija MDA u krvnoj plazmi predstavlja dobar indikator stepena oksidativnog oštećenja lipida u organizmu (5). Eksperimentalni rezultati pokazuju da dodavanjem organskog selena u ishrani krava može poboljšati njihovo zdravlje i reprodukciju (6).

Vitamin E deluje tako što neutrališe slobodne radikale, u reakciji sa njima se oksiduje u tokoferol semikvinon radikal, koji brzo podleže razgradnji, a prethodni radikal prima atom vodonika i neutrališe nespareni elektron. Vitamin E se nalazi u ćelijskoj membrani uz fosfolipide i nezasićene masne kiseline, tako može da prekine lančanu reakciju u kojoj učestvuju peroksil radikali masnih kiselina. Dokazano je da niska koncentracija vitamina E u cirkulirajućoj krvi predstavlja faktor rizika za zaostajanje posteljice kod krava (4,7)

Cilj rada je bio da se ispita uticaj aplikacije preparata Promtselen® u prepartalnom periodu na pojavu zaostajanja posteljice kod prvotelki, kao i uspeh ovog tretmana u prevenciji zaostajanja posteljice.

MATERIJAL I METODE

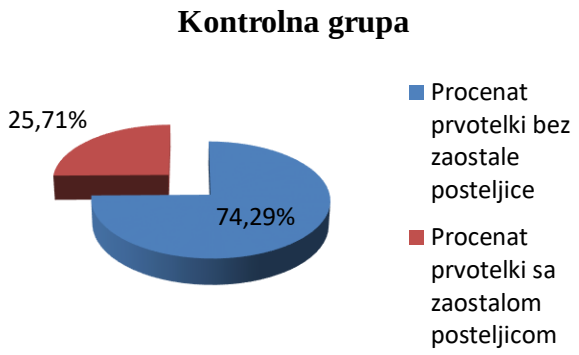
Ispitivanje je izvršeno na ukupno 140 visoko steonih junica Holštajn-frizijske rase na jednoj farmi, sve životinje su bile klinički zdrave i u optimalnoj kondiciji, sa normalnim tokom teljenja, starosti 22 do 25 meseci. U kontrolnoj grupi bilo je 70 junica kojima nije aplikovan ispitivani preparat, isti broj junica bio je u oglednoj grupi kojima je aplikovan preparat Promtselen® (proizvođač Veterinarski zavod Subotica) tri nedelje pred očekivan porođaj, jednokratnom intramuskularnom aplikacijom u dozi od 30 ml. Sastav preparata Promtselen® je: vitamin A-palmitat 50 000 i.j./ml, holekalciferol 25 000 i.j./ml, RRR-α-tokoferilacetat 20 mg/ml, natrijum-selenit, pentahidrat 0,5 mg/ml. Junice u obe grupe su hranjene obrokom iste recepture i boravile su u istim zoohigijenskim uslovima u skladu sa tehnološkim standardom farme. Nakon 48 časova od porođaja junice iz obe grupe su klinčki pregledane u cilju dijagnostike zastajanja posteljice. Nalaz zaostalih posteljica je evidentiran nakon čega su prikupljeni podaci obrađeni statističkim programom "R" upotrebom Chi-Square ($\chi 2$) testa. Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

REZULTATI

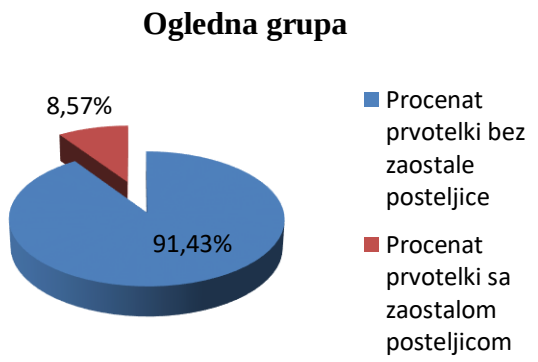
Pojava zaostale posteljice kod prvotelki kontrolne grupe je dijagnostikovana u 25,71% slučajeva (18/70), a u oglednoj grupi zaostala posteljica je dijagnostikovana u 8,57% slučajeva (6/70). Upotrebom Chi-Square ($\chi 2$) testa podaci iz ovog istraživanja ukazuju da postoji statistički značajna razlika na nivou $p<0.05$. Ovakvi rezultati dati su tabelarno (Tabela 1) i grafički radi lakšeg vizuelnog pregleda (Gragikon 1 i 2).

Tabela 1. Rezultati pojave zaostale posteljice u ispitivanim grupama

	Kontrolna grupa	**Ogledna grupa**
Broj oteljenih	**70**	**70**
Broj retencija	**18**	**6**
Procenat retencija	**25,71%**	**8,57%**



Grafikon 1. Prikaz pojave ZP u kontrolnoj grupi



Grafikon 2. Prikaz pojave ZP u oglednoj grupi

DISKUSIJA

Rezultati naše studije ukazuju na značajnu razliku u pojavi zaostajanja posteljice između prvotelki u kontrolnoj i oglednoj grupi. Prvotelke u kontrolnoj grupi su imale zaostalu posteljicu u 25,71% slučajeva, dok je kod prvotelki u oglednoj grupi postignuto značajno smanjenje pojave zaostale posteljice na 8,57%. Slične rezultate, kao u našoj studiji, prezentovali su i drugi autori koji su se bavili tematikom suplementacije selena i vitamina E na uspeh izbacivanja posteljice kod prvotelki. Tako, Eger i saradnici (8) su u trogodišnjoj studiji ustanovili smanjenje pojave zaostale posteljice kojima je dodat selen i vitamina E sa 17% na 7% pojave kod prvotelki. Slične rezultate dobili su u svom radu Jovanović i saradnici (2013) gde su postigli smanjenje pojave zaostale posteljice kod krava kojima je indukovan porođaj i to sa 66,7% u kontrolnoj grupi na 38,2% i 30,8% u grupama koje su dobijale suplementaciju selenom i vitaminom E. Manja incidenca zaostajanja posteljice se javljala u grupi koja je suplemenetirana većim dozama selena i vitamina E (9). Kim i saradnici (10) su ispitivali učestalost zaostajanja posteljice kod 120 mlečnih krava u tri grupe, jedna je bila tretirana selenom, druga vitaminom E, a treća i selenom i vitaminom E. Statistički najznačajniju razliku u smanjenju učestalosti zaostajanja posteljice dokazali su u grupi koja je tretirana sa selenom i vitaminom E zajedno. U jednom ogledu učestalost pojave zaostale posteljice nakon teljenja autori su ustanovili kod krava kontrolne netretirane grupe u 66,67% slučajeva dok kod tretiranih krava sa 20 ml Promtselena 30 dana pre telenja zaostala posteljica je dijagnostikovana kod 36,36% slučajeva. Najniža učestalost, zaostajanja posteljice, bila je kod krava tretiranih sa 40 ml Promtselena i iznosila je 30,79%. Autori navode da je očigledan trend smanjenja učestalosti pojave zaostajanja posteljice sa povećanjem količine suplementiranog selena (5). Mnogi autori dokazuju pozitivnu korelaciju između suplementacije selenom i vitaminom E sa uspehom izbacivanja posteljice kod krava nakon telenja (5,9), što pokazuju i rezultati našeg ogleda. Mehanizam delovanja selena objašnjavaju u antioksidativnoj njihovoj aktivnosti. Navodi se da selen ispoljava svoje biohemijsko dejstvo preko enzima glutation peroksidaze (GSH-Px), čiju su aktivnost u krvi mlečnih krava merili Jovanović i saradnici (9) i ustanovili da je aktivnost ovog enzima bila dvostruko veća u grupama krava koje su tretirane selenom nego u kontrolnoj netreiranoj grupi. Zanimljivo je da su isti autori ustanovili i da se aktivnost enzima nije značajno razlikovala kod grupa koje su tretirane različitim dozama selena. U istom radu autori navode da je aktivnost glutation peroksidaze u krvi bila je značajno niža kod krava sa zaostalom poseljicom nego kod krava koje nisu imale zaostalu posteljicu (11).

Oksidativni stres je glavni mehanizam oštećenja tkiva koji dovodi do zaostajanja posteljice, u tom smislu brojni podaci dokazuju da se može dokazati uticaj antioksidativnih materija mereći metaboličke produkte nastale u toku oksidativnog stresa (5,9). Malondialdehid (MDA) je jedan od nekoliko krajnjih produkata male molekulske mase koji nastaju oksidativnim raspadanjem polinezasićenih masnih kiselina koji se koristi kao indikator stepena oksidativnog oštećenja lipida u organizmu (5,9). Koncentracija MDA u plazmi je značajno niža kod životinja tretiranih selenom u odnosu na životinje koje nisu tretirane, takođe životinje sa zaostalom posteljicom imale su značajno veći MDA u plazmi od krava koje nisu imale zaostalu

posteljicu (9).

Slobodni radikali mogu smanjiti reproduktivnu funkciju delujući na više načina uključujući poremećaj sinteze steroida, prostaglandina i embrionalnog razvoja, u tom smislu vitamin E deluje kao antioksidans održavajući integritet fosfolipida protiv oksidativnih oštećenja tkiva (12).

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, moguće je zaključiti sledeće:

1. Tretman prvotelki jednokratnom i/m injekcijom 30 ml preparata Promtselen® smanjuje pojavu zaostajanja posteljice nakon partusa

2. Aplikacija ovog preparata predstavlja uspešan faktor u prevenciji zaostajanja posteljice kod prvotelki

LITERATURA

1. *Beagley J.C., Whitman K.J., Baptiste K.E., Scherzer J.. Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. J Vet Intern Med. 2010, 24(2):261-268*
2. *Dervishi E., Zhang G., Hailemariam D, Dunn S.M., Ametaj B.N. Occurrence of retained placenta is preceded by an inflammatory state and alterations of energy metabolism in transition dairy cows. J Animal Sci Biotechnol 2016, 7(26).*
3. *Rooh U.L.A., Bhat G.R., Ahmad A., Sarathi Swain P., Arunakumari G. Understanding patho-physiology of retained placenta and its management in cattle. Veterinary Clinical Science 2013, 1(1):1-9.*
4. *Joksimović Todorović M., Davidović V. The effect of antioxidants on preventing the retained placenta in dairy cows. Biotechnology in Animal Husbandry 2013, 29(4):581-9.*
5. *Valčić O., Jovanović I.B., Milanović S., Veličković M., Gvozić D. Efekat dodavanja selena (Promtselen®) na koncentraciju MDA i učestalost zaostajanja posteljice kod krava kojima je indukovan partus. Veterinarski žurnal Republike Srpske 2011, 11(2):148-54.*
6. *Khalili M., Chamani M., Amanlou H., Nikkhah A., Asghar Sadeghi A., Kamali Dehkordi F., Rafiei M., Shirani V. The effect of feeding inorganic and organic selenium sources on the hematological blood parameters, reproduction and health of dairy cows in the transition period, Acta Scientiarum. Animal Sciences 2020,42:e45371.*
7. *LeBlanc S.J., Herdt T.H., Seymour W.M., Duffield T.F., Leslie K.E. Peripartum Serum Vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and Their Associations with Disease. Journal of Dairy Science 2004, 87(3):609 -19.*
8. *Eger S., Drori D., Kadoori I., Miller N., Schindler H. Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta. J Dairy Sci. 2004, 68(8):2119-22.*
9. *Jovanović I.B.,Veličković M.,Vuković D., Milanović S., Valčić O.,Gvozdić D. Effects of Different Amounts of Supplemental Selenium and Vitamin E on the Incidence of Retained Placenta, Selenium, Malondialdehyde, and Thyronines Status in Cows Treated with Prostaglandin F2α for the Induction of Parturition. Journal of Veterinary Medicine 2013:867453.*
10. *Kim H.S., Lee J.M., Park S.B., Jeong S.G., Jung J.K., Im K.S. Effect of vitamin E and selenium administration on the reproductive performance in dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 1997, 10(3): 308-12.*
11. *Veličković M. 2015. Uticaj različitih doza prepartalno aplikovanog selena na smanjenje učestalosti zaostajanja posteljice kod visokomlečnih krava. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine u Beogradu.*
12. *Deori S., Bam J. Paul V. Efficacy of prepartal vitamin E and selenium administration on fertility in Indian yaks (Poephagus grunniens). Veterinarski arhiv 2014,84(5):513-9.*