

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 58 1 - 2 str. 1 - 180 Beograd, 2004.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ

■ Uvodnik	5
■ Huszenicza Gy., Kulcsar M., Katai L., Balogh O., Šamanc H., Ivanov I.: Postpartum Resumption of Cyclic Ovarian Function, First Estrus and Re-conception and their Relation to Energy Metabolism in High-producing Dairy Cows	9
Postpartalni nastavak ciklične funkcije jajnika, prvi estrus i ponovno oplodjenje i njihov odnos prema metabolizmu energije kod visoko-mlečnih krava Послеродовое продолжение циклической функции яичников, первый эструс и повторное оплодотворение и их отношение к метаболизму энергии у высоко-молочных коров	29
■ Radovanović Anita, Stevanović Jelka, Gledić Dušan: Apoptoza kao način prirodnog odumiranja ćelija jajnika Apoptosis as Form of Natural Ovarian Cell Death Апоптоз как способ природного отмирания клеток яичников	43
■ Kovačević-Filipović Milica, Božić Tatjana, Stevanović Jelka: Značaj različitih vrsta životinja u eksperimentalnim modelima za proučavanje hematopoeze <i>in vivo</i> Significance of Different Animal Species in Experimental Models for <i>in vivo</i> Investigations of Hematopoiesis Значение различных видов животных в экспериментальных моделях для изучения гематопоеза <i>in vivo</i>	55
■ Lazić S., Petrović T., Pušić I., Velhner Maja: Najčešća virusna oboljenja teladi u industrijskom odgoju Most Frequent Calf Diseases in Industrial Breeding Самые частые вирусные заболевания телят в промышленном разведении . . .	67

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

■ Đoković R., Šamanc H.: Sadržaj lipida i glikogena u jetri kod visoko-produktivnih mlečnih krava u peripartalnom periodu Lipid and Glycogen Contents in Liver of High-Yield Dairy Cows in Peripartal Period Содержание липидов и гликогена в печени высоко-продуктивных молочных коров в перипартальном периоде	77
--	----

■ Jurčević A., Pengov A.: Uticaj raznih činitelja na infekcije mliječne žlezde uzrokovane bakterijama vrste <i>Staphylococcus aureus</i> Effect of Different Factors on Mammary Gland Infection with <i>Staphylococcus Aureus</i> Bacteria Влияние разных деятелей на инфекции молочной железы бактериями <i>Staphylococcus aureus</i>	81
■ Vuković V., Dugalić-Vrndić Nada: Rezidue oksitetraciklina u mleku krava posle intrauterine aplikacije Oxitetracycline Residue in Cow Milk after Intrauterine application Остатки окситетрациклина в молоке коров после внутриматочной аппликации	95
■ Vukavić Tamara, Došen R., Ličina Jasna: Ispitivanje dve oralne rehidracione solucije u tretmanu prasadi sa akutnim gastroenteritisom Investigations of Two Oral Rehydration Solutions in Treatment of Piglets with Acute Gastroenteritis Испытание двух оральных регидрационных солюций в лечении поросят с острым гастроэнтеритом	105
■ Dinev I., Borissov I., Dimov D.: Incidence of Epulides in the Dog – A Retrospective Histopathological Study Učestalost epulida kod pasa – retrospektivna histopatološka istraživanja Частота эпюлидов у собак – ретроспективные гистопатологические исследования	113
■ Aleksić-Kovačević Sanja, Marinković D.: Infektivni peritonitis mačaka (FIP) u našem sekcionom materijalu Feline Infectious Peritonitis (FIP) in our Section Material Инфекционный перитонит кошек (ИПК) в нашем секционном материале	121
■ Oguz M. C., Oguz Öztürk M., Güre H.: Seasonal Variation of the Plerocercoid <i>Ligula intestinalis</i> (L.) Observed in Roach (<i>Rutilus rutilus</i>, L) from the Yenice Irrigation Pond, Çanakkale, Turkey Promene u prisustvu plerocerkoida gliste <i>Ligula intestinalis</i> (L) u zavisnosti od godišnjeg doba kod crvenperke (<i>Rutilus rutilus</i>, L) iz Jenis jezera za navodnjavanje kod grada Çanakkale, Turska Изменения в присутствии плероцеркоидоз глиста <i>Ligula intestinalis</i> (L.) в зависимости от времени года у красноперки (<i>Rutilus rutilus</i>, L.) из Енис озера для орошения у города Канакале, Турция	127

STRUČNI RADOVI – PROFESSIONAL PAPERS – СПЕЦИАЛИСТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

- Bilal T., Ercag E., Demirel G., Bilal T.: Comparison of some Blood Parameters, Serum Vitamin E and Mineral Concentrations of Arabian and English Thoroughbred Race Horses
 Poređenje nekih parametara u krvi, serumskih koncentracija vitamina E i minerala kod arapskih i engleskih čistokrvnih trkačkih konja
 Сравнение некоторых параметров в крови, сывороточных концентрациях витамина E и минералов в арабских и английских чистокровных беговых лошадей 131
- Kosec M., Mrkun J., Klobučar I., Kadunc Kos V.: Comparison of Endoscopic, Ultrasound and Microbiological Examinations in Diagnosis of Reproductive Disorders in Mares
 Upoređivanje endoskopske, ultrazvučne i mikrobiološke dijagnostike poremećaja u plodnosti kod kobila
 Сравнение эндоскопической ультразвуковой и микробиологической диагностики помех (нарушений) в плодovitости у кобыл 145
- Baján L., Jenčík F., Tesfaye A., Jr. Buleca J., Bugarsky A., Jr. Skalka J., Ivičák J.: Monitoring the Occurrence of *Patens Foramen Ovale* in Fattening Swine Breeds Continuation
 Praćenje pojave *Foramen ovale patens* kod još nekih rasa tovnih svinja
 Слежка явления *Foramen ovale patens* у ещё некоторых пород откормочных свиней 151
- Tojagić S., Kevrešan Ž., Jokanović Marija: Neki pokazatelji kvaliteta mesa vinogradarskog puža (*Helix pomatia*)
 Some Quality Parameters of Land Snail Meat (*Helix pomatia*)
 Некоторые показатели мяса виноградной улитки (*Helix pomatia*) 157

PRIKAZI – PRESENTATIONS – ПРИКАЗИ

- Predojević M. R., Marinković M., Jovičin M., Prka I.: Neplodnost priplodnog bika u tehnologiji osemenjavanja
 Infertility of the Breeding Bull in Insemination Technology
 Неplодovitиость племенного быка в технологии осеменения 163

IZ ISTORIJE VETERINARSTVA – FROM VETERINARY HISTORY – ИЗ ИСТОРИИ ВЕТЕРИНАРСТВА 171

DOKTORI, MAGISTRI I SPECIJALIZANTI – DOCTORS OF SCIENCE, MAGISTERS OF SCIENCE AND SPECIALISTS – ДОКТОРЫ, МАГИСТРЫ И СПЕЦИАЛИЗАНТЫ 173

DIPLOMIрани STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE – ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ 174

KALENDAR – CALENDER – КАЛЕНДАР 179

VET. GLASNIK	Vol. 58	1 - 2	Str. 1 - 180	BEOGRAD, 2004.
--------------	---------	-------	--------------	----------------

VET. GLASNIK	Vol. 58	1 - 2	Str. 1 - 180	BEOGRAD, 2004.
--------------	---------	-------	--------------	----------------

VETERINARSKI glasnik

1904 – 2004

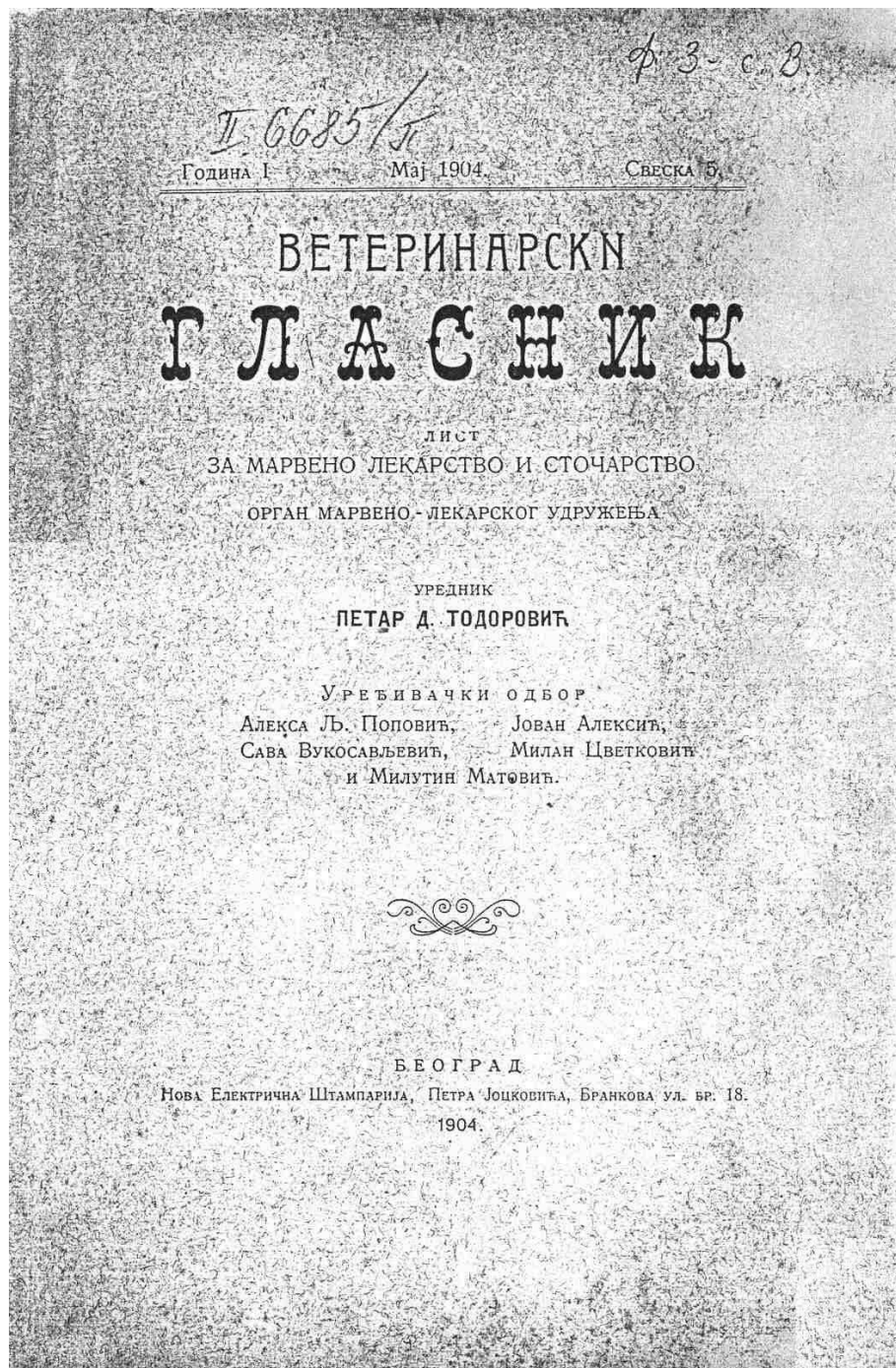
U želji da reše svoja pitanja, marveni lekari Srbije su se udružili i osnovali Udruženje marvenih lekara Srbije 1890 i pokrenuli 1903. godine svoj časopis „Veterinarski glasnik” u kome su iznosili stručna i naučna pitanja iz oblasti veterinarske medicine i stočarstva, kao i da brane svoje staleške interese.

Na jednoj od sednica Udruženja marvenih lekara odlučeno je da se osnuje časopis u kome bi se objavljivali radovi iz oblasti veterinarstva, o načinima unapređenja stočarstva, o izradi Statuta i drugim važnim pitanjima (proširivanjima veterinarske farmakopeje, izmenama i dopunama zakonskih propisa...). Do tog vremena oni su stručne publikacije štampali u časopisima „Srpski arhiv” (organ Srpskog lekarskog društva), „Težak” (organ Poljoprivrednog društva), „Ratnik” i „Narodno zdravlje”.

„Veterinarski glasnik” je osnovan decembra 1903, a prvi broj je ugledao svetlost dana januara 1904. godine. Petar D. Todorović (1854 - 1917) bio je prvi urednik „Veterinarskog glasnika”, časopisa za marveno lekarstvo.



Osnivačka skupština Udruženja veterinara Srbije 1903. godine



САДРЖАЈ:

	СТР.
<i>О положају коња у културној историји од К. Врбића</i>	201
<i>Основна начела за оцењивање коња у погледу погодности њихове за рад, од О. Репића</i>	203
<i>Сакагија, узроци њеног појављивања и начин како би се иста сузбити могла, од Милана Митровића</i>	208
<i>Прострел, огњица, далак, зли, црни пришт, у виду приче, за поуку народну, од П. Д. Т.</i>	217
<i>Туберкулоза људи и стоке, (наставак) од П. Д. Т.</i>	228
<i>Прикупљање података за упознавање сточарства у Срп. земљама, (Свршетак):</i>	
Татаркур	233
Гунтураћ — Кад коњ задржи мокраћу — Болести очију, од К. Врбића	234
Метање крста на стоку, — в ³ —	235
Коза дојкиња ждребади, Рибнер	236
Судско ветеринарство у Србији, Рибнер	236
<i>Белешке</i>	
Уплив хране на жребне кобиле, П.	237
Лечење антиномикозних отока, П. Д. Т.	238
О давању рошчића коњима	239
Интер. нови огледи с антракс. бацилима	240
<i>Гласник</i>	
Преокрет на боље	242
Извоз стоке, живине и меса, за месец Април	246
Стање заразних болести, до 25 маја ов. год.	247
Одговори Уредништва	248

СТАЊЕ ЗАРАЗНИХ БОЛЕСТИ

на домаћој стоци у Србији
 За време од 25. априла до 25. маја 1904 године, било је у Србији на домаћој стоци
 ових заразних болести:

Болести	Округ	Срез	Општина	Место	Врста стоке	Заостао	Принов- љено	Света Богова	Угинуло	Убијено	Одла- вило	Остало да бољује
Свињска куга (Pestis suila)	Ваљевски	Посавски	Обреновачка	Обреновац	Свиње	27	—	27	16	—	11	—
	Топлички	Прокупачки	Белољинска	Тули	•	3	+	3	—	—	3	—
	Крушевачки	Жупски	Александаров	Д. Вратари	•	4	—	4	2	—	2	—
Црвени вестар на свињама (Erysipelas suile)	Топлички	Добрички	Д. Црниловач	Бадњевац	Свиње	9	—	9	—	—	9	—
	Пиротски	Нишавски	Церовачка	Шугрин	Овце	—	4	4	1	—	2	1
Строка (Variola ovina)	Пиротски	Б.-паланачки	Бела Паланка	Бела Паланка	Говеда	—	1	1	1	—	—	—
	Крајински	Неготински	Корбуловска	Корбулово	•	—	1	1	1	—	—	—
Беснило (Lyssa)	Ужички	Рачански	Б. Баштинска	Бајина Башта	Пси	—	1	1	—	1	—	—
		Пожешки	Пожешка	Пожеша	•	—	1	1	—	1	—	—
	Београд	Космајски	В. Иваначка	Вел. Иванча	Мачке	—	1	1	—	1	—	—

POSTPARTALNI NASTAVAK CIKLIČNE FUNKCIJE JAJNIKA, PRVI ESTRUS I PONOVO OPLOĐENJE I NJIHOV ODNOS PREMA METABOLIZMU ENERGIJE KOD VISOKO-MLEČNIH KRAVA*

Gy. Huszenicza, M. Kulcsar, L. Katai, O. Balogh, H. Šamanc, I. Ivanov**

U proteklih nekoliko decenija uočeno je stalno povećanje prosečne proizvodnje mleka kod mlečnih krava širom sveta. U isto vreme, međutim, zapaženo je dramatično smanjenje reproduktivnih rezultata. Ova tendencija je pripisana povećanom pojavljivanju bakterijskih komplikacija tokom involucije uterusa, kao i velikom broju disfunkcija jajnika u postpartalnom periodu. Cilj ovoga rada je da se razmotri fiziologija i patologija ove druge pojave, tog zaista kompleksnog fenomena. Nutriciona osnova ovog procesa je da se potrebe visoko mlečnih krava naglo promene posle partusa kada se dnevni prinos mleka naglo povećava, a posledični negativni energetske bilans se produžava na 10 do 12 sedmica. U kontekstu visoke genetske vrednosti mlečnih krava, postpartalni negativni energetske bilans je razlika između dijetetskog unosa iskoristive energije i potrošnje energije za održavanje telesne mase i sinteze mleka. U principu, to je fiziološki fenomen koji, međutim, može da rezultira u manje ili više teškim poremećajima kako u metabolizmu, tako i u reprodukciji, i tako može da dovede i do velikih finansijskih gubitaka u savremenoj proizvodnji mleka [112]. U prvih tri do četiri sedmice posle teljenja, negativni energetske bilans je u visokoj korelaciji i sa prinosom mleka i intervalom do prve ovulacije. Zbog toga što je ukazano da broj ovulatornih estrusnih ciklusa, koji prethode inseminaciji, utiče na stepen koncepcije, dužina postpartalnog intervala do prve ovulacije obezbeđuje važan parametar za procenu efekta negativnog energetske bilansa na reproduktivne rezultate [19, 20].

Ključne reči: visoko-mlečne krave, metabolizam energije, post partus, ciklična funkcija jajnika, prvi estrus, ponovno oplođenje

* Rad primljen za štampu 26. 9. 2003. godine

** Gyula Huszenicza, M. Kulcsar, L. Katai, O. Babogh, Sent Istvan univerzitet, Fakultet veterinarskih nauka, Budimpešta, Mađarska; dr Horea Šamanc, profesor, dr Ivan Ivanov, profesor, fakultet veterinarske medicine, Beograd

Patofiziologija negativnog bilansa energije kod mlečnih krava u postpartalnom periodu

• Povećana mobilizacija lipida i njene posledice

Tokom perioda negativnog energetskeg bilansa, visoko mlečne krave moraju da mobilišu svoje telesne rezerve, pre svega supkutane rezerve lipida (*povećana ili prinudna mobilizacija lipida*). Uopšte uzev, životinje koje su previše hranjene pre teljenja (ocena telesne kondicije: pri teljenju: 3,75) najugroženije su (*sindrom debele krave*). Naglo smanjenje telesne mase je najočitiji klinički simptom povećane mobilizacije lipida. Kao rana posledica može da se vidi nagli porast nivoa neesterifikovanih masnih kiselina u cirkulaciji, što prati – vrlo često, ali ne u svim slučajevima – povećana proizvodnja OH-biturata i drugih ketonskih tela (*hiperketonemija*). U isto vreme lipidi, uglavnom triacilgliceridi akumuliraju se u jetri (*bolest „masne” jetre*). Ovi umereni do ozbiljni oblici masne jetre (sadržaj masti: 20%) mogu da rezultiraju u dobro definisanim poremećajima hepatocelularnih funkcija (glikoneogeneza, sinteza holesterola, metabolizam žučnih kiselina i bilirubina, inaktivacija steroidnih hormona i insulina, sinteza apolipoproteina i hidrosilacija holekalciferola). Eliminisanje bromosulfaleina postaje znatno sporije i koncentracije *ukupnog bilirubina* i *ukupnih žučnih kiselina* u plazmi su u pozitivnoj korelaciji sa stepenom infiltracije masti u hepatocyte. U isto vreme, u perifernoj krvi mogu da se uoče *hipoalbuminemija*, očito smanjeni nivoi *lipoproteina veoma male gustine* i *lipoproteina male gustine*, niže i od normalnih koncentracija svih *supstancija transportovanih lipoproteinima* (*ukupni holesterol*, *triacilgliceridi*, β -*karo-**ten* i *tokoferol*). Iako nije uočljiv štetan efekat infiltracije masti na membranu, umerena povećanja su najčešće uočena u serumskim aktivnostima aspartat aminotransferaze, alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze. U težim oblicima hepatične lipidoze smanjena je hepatocelularna sposobnost detoksikacije amonijaka kod preživara kao i *endotoksina* apsorbovanog iz gastrointestinalnog trakta ili oslobođenog zbog neke bolesti usled endotoksina, uključujući akutni gnojni endometritis, ili razne oblike mastitisa. Takođe je uočeno da se javlja i poremećaj imunog sistema, za koji se zna da dotičnu jedinku čini podložnom bakterijskim komplikacijama tokom involucije uterusa, kao i *mastitisu*. Biohemijske promene indukovane pojačanom mobilizacijom lipida kod krave stvaraju predispoziciju ka zadržavanju *posteljice*, *mlečnoj groznici* i *dislokaciji sirišta*, kao i raznim oblicima *ketoze*. Ketoza je direktna posledica negativnog energetskeg bilansa i pojačane mobilizacije lipida. Značajno se povećava unos neesterifikovanih masnih kiselina iz krvi u jetru. Ove masne kiseline se ili esterifikuju do triacilglicerida, ili se katabolišu do acetil-koenzima A. Dostupnost oksaloacetata, koji se uglavnom dobija iz glikogenoplastičnih prekursora kao što su propionat, piruvat, glicerol, ili izvesne amino-kiseline, određuje stepen korišćenja acetil-koenzima A u Krebsovom ciklusu. Ukoliko nije dovoljna snabdevenost ovim prekursorima, kao što se često dešava tokom negativnog energetskeg bilansa, smanjuje se dostupnost oksa-

loacetata za korišćenje acetil-koenzima A u Krebsovom ciklusu. Višak acetil-koenzima A se zatim koristi za ketogenezu i kod krava mogu da se razviju supkliničke ili kliničke forme ketoze. Izgleda da je neodgovarajuća snabdevenost glikogeno-plastičnih prekursora ključni događaj u ovom procesu [94, 95, 44, 45, 57, 54, 59, 106, 56, 28, 77, 49, 105, 89, 48, 144, 5, 16, 88, 139, 73, 137, 112, 113].

Endokrinologija negativnog bilansa energije

Postpartalni negativan bilans energije može da izazove značajne endokrine promene koje su poznate kao važni činioci u regulaciji procesa mobilizacije lipida. Osim uloge *kateholamina*, najranije promene karakterišu povišene koncentracije glukagona i smanjene koncentracije insulina, dok nivo *hormona rasta* ostaje nepromenjen ili se čak blago povećava. U isto vreme, oslobađanje *hepatičnog faktora rasta-I sličnog insulinu* indukovano sa *hormonom rasta* i *insulinski odgovor β -ćelija pankreasa* indukovano *glukagonom* su smanjeni, a izvesna tkiva postaju manje osetljiva na insulin. Svi ovi endokrini događaji mogu da pomere metabolizam iz anaboličnog u katabolično stanje [110, 109, 61, 130, 128, 90, 30, 58, 60, 136, 39, 115, 148, 50, 134, 108]. Ova promena metabolizma može da bude pojačana endokrinim posledicama simultanog izlaganja endotoksinu [38, 37, 70]. Periferna tkiva pokušavaju da uklope svoj trenutni energetskei metabolizam u ovo novo katabolično stanje prouzrokovano negativnim energetskeim bilansom povećanjem kapaciteta inaktivirajućeg mehanizma (koji proizvodi 3,3,5-trijodotironin – reverzni trijodotironin – rT_3) tiroidnih hormona (tiroksin T_4 i 3,3,5-trijodotironin T_3). Stoga, iako je T_4 odgovor tireoidne žlezde izazvan oslobađajućim tireotropnim hormonom (tireotropin) samo slabo izmenjen, opisani su jasno smanjeni novoi T_4 i T_3 i povećane koncentracije rT_3 u perifernoj krvi [26, 17, 101, 103, 109, 140, 141, 58, 99, 138]. Takođe, odavno se smatralo da je uključena i adrenokortikalna funkcija (proizvodnja kortizola), međutim, od tada nije pronađena bilo kakva eksperimentalna potvrda ove hipoteze. U poslednje vreme, ispitivanja regulacije unošenja hrane i metabolizma energije se usmeravaju na pretpostavljenu ulogu *leptina*. Ovaj nedavno identifikovan proteinski hormon sličan citokinu (16 kDa) luči uglavnom masno tkivo i veruje se da deluje preko nervnih centara hipotalamusa u posredovanju neuroendokrinih mehanizama odgovornih za snabdevanje organizma energijom. Moguće je da signalizira o nutricionom statusu i za periferne organe. Ovaj hormon je jedan od primarnih činilaca koji prenosi informaciju o nivou rezervi periferne energije do regiona mozga koji treba da usaglašava ponašanje u hranjenju, metabolizam i endokrine funkcije da bi se održala homeostaza energije [150, 43, 68, 63]. Kod miševa, pacova, ljudi, a takođe i kod preživara i svinja, njegova koncentracija u krvi može da se menja direktno sa promenama u telesnoj masi i deponovanih masti u telesnim depoima. Leptin doprinosi regulaciji kaliozne masti u telesnim depoima. Izlaganje delovanju insulina, glikokortikosteroida i endotoksina može da poveća ekspresiju gena za leptin i/ili nivo leptina u plazmi, dok leptin direktno može da koči sintezu kortizola u adrenalnim ćelijama. Na taj način,

leptin i kortizol interreaguju u mehanizmu negativne povratne sprege. Inkubacija kultura adipocita 24 časa sa T_3 (ali ne i sa T_4) značajno povećava ekspresiju iRNA za leptin i nivo izlučenog leptina. Oslobođanje leptina iz adipocita je regulisano adrenergičnom stimulacijom, a veruje se i da je povezano sa lučenjem hormona rasta i IGF-I [27, 24, 62, 63, 87, 41, 74, 25, 69]. Test sistemi (za više vrsta životinja i kasnije specifični samo za jednu vrstu), koji omogućavaju preciznu kvantifikaciju leptina u krvnoj plazmi kod različitih vrsta domaćih životinja, razvijeni su tek kasnih devedesetih godina i na početku ove dekade. Od tada, dostupno je sve više podataka koji nagoveštavaju da je leptin možda povezan sa negativnim energetske bilansom i kod preživara, uključujući i goveda [14, 24, 92, 4, 31, 36, 72, 13, 25, 69].

Funkcija jajnika i negativan bilans energije kod postpartalnih mlečnih krava

• Nastavak regularnog rasta folikula. Početak ciklične aktivnosti jajnika

Kod skoro svih mlečnih krava koje ne doje telad koncentracije FSH u plazmi se povećavaju do najviših vrednosti četiri do pet dana posle teljenja. Ovaj prvi „peak” FSH odmah prati pojava prvog postpartalnog talasa folikula koji proizvodi prvi dominantni ($>9\text{mm}$) folikul. Zapaženo je da se zatim javljaju pravilni novi talasi FSH koje prati rast novih populacija folikula i proizvodnja novih dominantnih folikula, uprkos prosečnom negativnom bilansu energije od $-7,5\text{ Mcal/dan}$ tokom prvog tronedelnog perioda posle teljenja [10]. Čini se da pojavu folikularnih talasa u ranom postpartalnom periodu krava ne remeti negativan bilans energije i da se javlja kao odgovor na ponovno uspostavljanje periodičnih porasta koncentracije FSH koji su sinhronizovane samo sa završetkom gestacije i porođaja. Čini se da je tokom negativnog bilansa energije u prvim sedmicama laktacije deficitarn LH, a ne FSH. Prema tome, izgleda da negativni energetske bilans ne utiče na regularan početak rasta folikula koji zavisi od FSH [79, 116, 104, 10, 12]. Međutim, neophodna su dalja istraživanja steroidogene sposobnosti prvog dominantnog folikula formiranog tokom druge sedmice posle teljenja, kao i činilaca koji utiču na njegovu sudbinu.

Opisana su tri oblika razvoja folikula u postpartalnom periodu u zavisnosti od sudbine prvog dominantnog folikula [116, 104, 10, 11, 12]: (1) *ovulacija* dominantnog folikula prvog talasa; (2) razvoj *anovulatornog* dominantnog folikula prvog talasa koga prate (više drugih) dodatni talasi razvoja folikula pre prve ovulacije; (3) razvoj dominantnog folikula prvog talasa koji postaje *cističan*. Oblici 1 (ovulatorni) i 3 (cistični) karakterišu se razvojem dominantnog folikula koji proizvodi 17-estradiol , dok oblik 2 karakteriše rast dominantnog folikula koji proizvode samo niske periferne koncentracije 17-estradiola i postaju atretični. U slučaju oblika 1, ovarijalna aktivnost postaje ciklična posle ovulacije dominantnog folikula prvog talasa. Oblici 2 i 3 mogu da budu ponovljeni više puta, tako da i regresija

dominantnog folikula prvog talasa i onih sledećih i formiranje anovulatornih cista može da produži interval do prve postpartalne ovulacije (pp. *aciklični period*). Od ranih osamdesetih godina opšte je prihvaćeno da je balans energije jedan od najvažnijih činilaca koji utiču na trajanje prvog acikličnog perioda: prva postpartalna ovulacija kod mlečnih krava koje ne doje telad, javlja se oko 10. dana posle nadiranja negativnog energetskeg bilansa [18, 22].

Postoji svega nekoliko radova u literaturi u kojima se ispitivao direktan odnos između negativnog energetskeg bilansa i folikularne dinamike kod postpartalnih mlečnih krava. Lucy i sar. [83] pokazali su da se broj folikula klase 3 (prečnika 10 do 15 mm) – ali ne i klase 1 (3 do 5 mm) i 2 (6 do 9 mm) povećao sa većim pozitivnim energetskeg balansom pre 25. dana posle teljenja. Ovaj podatak ukazuje da, kako se kod krava popravlja energetskeg balans, pojačano je i pomeranje folikula iz manjih u veće klase. Tokom prvog postpartalnog folikularnog talasa (8 do 14. dan posle teljenja) kod krava koje dobijaju tri nivoa masti u ishrani, broj folikula klase 1 i 2 nije u korelaciji sa energetskeg balansom tokom 1. ili 2. nedelje postpartalno, bez obzira na vrstu ishrane [11]. Razvoj dominantnog folikula kod postpartalnih mlečnih krava podnosi stanje negativnog energetskeg bilansa. Međutim, nekoliko autora je ukazalo da su krajnji prečnik dominantnog folikula i proizvodnja 17 -estradiola pod uticajem metaboličkih činilaca: i veličina dominantnog folikula i nivo 17 -estradiola u plazmi povećali su se pošto se energetskeg balans poboljšao posle svog najizraženijeg negativnog nivoa [10, 11].

Metabolički i endokrini signalni mehanizmi

Uticaj negativnog energetskeg bilansa na vreme prve postpartalne ovulacije potvrđen je relativno davno [18, 22]. Međutim, fiziološki signalni mehanizmi koji obaveštavaju osovinu *hipotalamus-prednji režanj hipofize-jajnik* (HHJ) o trenutnoj fazi energetskeg bilansa ostali su nepoznati neko vreme, a neki detalji su čak i danas pod znakom pitanja. Ograničeno unošenje energije nije izmenilo gustinu hipofiznih GnRH receptora kod krava postpartalno [96], ali su ograničenja energije u obroku pratila smanjeni [114], kao i povećani [115] odgovor na egzogeni GnRH. Ustanovljeno je da *gubitak pulsatorne sekrecije LH* rezultira iz produženog neadekvatnog snabdevanja energijom i kod tovnih rasa krava koje doje telad i kod mlečnih krava koje ne doje telad [79, 23, 102]. Do sada je opšte prihvaćeno da ponovno uspostavljanje sheme pulsatorne sekrecije LH koja uzrokuje predovulatorni razvoj i funkciju folikula predstavlja ključni događaj u povratku ovarijalne cikličnosti kod postpartalnih mlečnih krava koje su prošle kroz fazu najnižeg stepena balansa energije [12]. Izgleda da se postpartalni oporavak hipofiznog sadržaja LH i odgovora na GnRH završava do 10. dana posle teljenja kod mlečnih krava, a dostupni podaci po vrstama sugerišu da se primarni efekat smanjenog unošenja energije ispoljava uglavnom preko hipotalamusa [96, 117]. U prvim nedeljama laktacije smanjena aktivnost GnRH pulsatorna kod

postpartalnih mlečnih krava ispoljava se kao smanjena pulsatorna aktivnost LH folikularne steroidogeneze koja je neophodna za indukovanje rasta LH sličnog predovulatornim, kao i pratećoj ovulaciji. Međutim, naizgled niska pulsatorna frekvencija LH (2 pulsa na 6 časova) očito je dovoljna da podrži morfološki razvoj dominantnog folikula do 2. sedmice *post partum*. Ovo zapažanje je u skladu sa rastom i diferencijacijom kompetentnog dominantnog folikula tokom srednje lutealne faze estrusnog ciklusa krava kada je frekvencija LH pulsa niska [33].

Istraživanja potencijalnih metaboličnih signala za osovinu hipotalamus – prednji režanj hipofize – jajnik uglavnom su usmeravana na metabolite u krvi (neesterifikovane masne kiseline, glikoza) i metaboličke hormone (odnos insulin:hormon rasta, insulin, IGF-I), za koje se zna da variraju tokom izmenjenih stanja energetskog metabolizma. Međutim, što se tiče neesterifikovanih masnih kiselina i glikoze, postoje veoma kontradiktorna mišljenja [66, 23, 50]. Stoga je danas opšteprihvaćeno da bilo koji mehanizam, koji vezuje metabolički status sa osovinom hipotalamus – prednji režanj hipofize – jajnik na kraju mora da uključuje i hormonsku komponentu [12]. Istraživanja Beama i Butlera [10, 11] potvrdila su fiziološku važnost odnosa insulin:hormon rasta u plazmi i u dane najniže vrednosti negativnog energetskog bilansa, što ukazuje da ove hormonske razlike u intermedijalnom postpartalnom periodu mogu da utiču na prvi talas folikularne funkcije. Ustanovljeno je da insulin stimuliše folikularne ćelije *in vitro* i kod krava [127], a mala produženja postpartalnog perioda mogu da imaju važan uticaj tokom vrlo ranih faza razvoja folikula. Koncentracije IGF-I i jednog od njegovih vezujućih proteina (IGFBP-2) u krvi u peripartalnom periodu bili su dobri pokazatelji sposobnosti krava sa ograničenom energijom da nastave ciklus posle teljenja [108]. Osim toga, povećani odnos insulin:hormon rasta posle porođaja može da izazove veću proizvodnju hepatičnog IGF-I [91], što rezultira u povećanim količinama ovog faktora rasta ranije nego inače posle teljenja. Iako su izneta i neka naizgled kontradiktorna zapažanja kod prvotelkinja [128], tokom prve dve sedmice postpartalno, Beam i Butler [10, 11] uočili su značajno veću koncentraciju IGF-I u krvi krava koje su proizvodile 17 -estradiol, ovulatorni dominantni folikul prvog talasa nego kod onih krava sa 17 -estradiol-anovulatornim dominantnim folikulom prvog talasa. Kod krava koncentracije IGF-I u krvi bile su u korelaciji sa nivoima IGF-I u folikularnoj tečnosti velikih folikula [34]. Zna se da i insulin i IGF-I stimulišu *in vitro* steroidogenezu i proliferaciju goveđih kultura teka ćelija i granulozu ćelijskih kultura [127, 129]. U *in vitro* uslovima, IGF-I povećava broj mesta koja vezuju LH u goveđim teka ćelijama i pojača proizvodnju androstenediona i progesterona indukovanu LH [129]. Ovaj nalaz potvrđuje zapažanje Beama i Butlera [11] *in vivo*, koji su pokazali očigledan odnos između steroidogene aktivnosti dominantnih folikula prvog talasa i nivoa IGF-I u krvi. U kulturama granulosa ćelija čoveka i svinja T₃ takođe može da povećava aktivnost aromataze koja proizvodi estrogen i time prinos 17 -estradiola [87, 52, 143, 53]. Do sada postoji samo jedna studija u kojoj se procenjuje efekat T₃ i T₄ na steroidogenezu ovarijalnih ćelija kod krava: Spicer i sar [126] primetili su direktan stimulatorni efekat T₃ i T₄ na steroido-

genezu teka ćelija. Stimulatorni efekat T_3 i T_4 na proizvodnju androstenediona (tj. povećanje dva do četiri puta) bio je sličan uticaju LH na proizvodnju androstenediona (tj. povećanje četiri ili devet puta). Stimulatorni efekat T_3 bio je u dve faze (niska doza je stimulirala, visoka nije imala efekta), dok je uticaj T_4 bio sličan kod obe doze. Nasuprot tome, T_3 je inhibirao hCG-indukovanu sekreciju androgena u teka ćelijama svinja [53]. Prema tome, mogu da postoje razlike između vrsta i/ili uslova kulture u odnosu na regulaciju tekalne steroidogeneze tireoidnim hormonima, kao i kod steroidogeneze granulosa ćelija. Kod krava, T_4 je bio mnogo slabiji stimulator (tj. povećanje do 1,3 puta) progesterona koji proizvodi teka ćelija nego što je to bio LH (tj. povećanje četiri do devet puta), i njegov efekat je bio uočljiv samo na hipertireoidnim nivoima (100 ng/ml, ali ne i 30 ng/ml); T_3 nije imao uticaja na proizvodnju progesterona granulosa i teka ćelija u ovim istraživanjima [126]. Ustanovljeno je da postoji odnos između niskog $17\text{-}\beta$ -estrogena, negativnog energetskog bilansa i niskog T_3 i kod mladih žena atletičarki koje se takmiče u trčanju [149]. Nasuprot tome, izazvani hipotireoidizam nije uticao na prečnik dominantnih folikula kod multiparnih krava rase brahman [32].

Izazivanjem hipotalamične GnRH i pituitarne gonadotropne sekrecije, zapaženo je i da *leptin* utiče na genitalne funkcije glodara, primata i nedavno ustanovljeno, preživara. Iskustva su potvrdila da bi ovaj hormon mogao da bude jedan od dugo traženih indikatora nutricionog statusa koji omogućava nastavak reproduktivnih procesa. Rezultati kod glodara, primata i kod ovaca nagoveštavaju da je supresija GnRH/LH tokom gladovanja posredovana centralnim dejstvom leptina u hipofizi ili mozgu [40, 97, 98, 93, 122]. Osim toga, Ahima i sar [2] ukazali su da tretman leptinom ubrzava pubertet kod normalnih miševa u dozama koje ne utiču na promene telesne mase i sugerisali da dejstva leptina u regulaciji neuroendokrine i reproduktivne funkcije kod normalnih miševa nisu podređena efektima energetskog balansa. Niska koncentracija leptina je izazvala značajno povećanu proizvodnju neuropeptida Y u hipotalamusu [1], a povećani neuropeptid Y inhibirao je gonadnu osovinu kod laboratorijskih glodara, kao i preživara, pa se zaključilo da oštećena reproduktivna funkcija u lošim uslovima metabolizma kao što je gladovanje, može da bude posledica prevelikog oslobađanja neuropeptida Y u hipotalamusu [47, 118]. Nekoliko zapažanja sugerise da leptin predstavlja važnu biohemijsku poruku između depoa masti i reproduktivne osovine [1, 6, 2]. Receptori za leptin su otkriveni i u gonadama. U *in vitro* uslovima, leptin ima slabe inhibitorne efekte na steroidogenezu teka ćelija i granulosa ćelija indukovanu gonadotropinom, i/ili IGF-I [128]. Dakle, može da se pretpostavi da ne samo hipoveć i hiperleptinemija mogu negativno da utiču na reprodukciju domaćih životinja, uključujući krave [122].

Promene koncentracije leptina u plazmi peripartalnih mlečnih krava merene su tokom perioda od 35. dana pre do 56. dana posle teljenja. Koncentracija leptina u plazmi bila je najveća tokom kasne faze graviditeta i smanjila se za oko 50 posto posle teljenja. Koncentracija leptina u plazmi ostala je niska tokom rane laktacije i pored postepenog poboljšanja energetskog statusa životinja.

Odgovarajuće promene dogodile su se u velikoj količini iRNA za leptin u supkutanom belom adipoznom tkivu. Postpartalno smanjenje leptina u plazmi bilo je posledica negativnog energetskog bilansa zato što je leptin plazme ostao visok kod krava koje nisu muzli posle porođaja. Koncentracija leptina u plazmi bila je u pozitivnoj korelaciji sa plazma koncentracijama insulina i glikoze i u negativnoj korelaciji sa plazma koncentracijama hormona rasta i neesterifikovanih kiselina [13]. Postoji ograničen broj podataka o međudodnosu između nivoa leptina u krvi i postpartalnom nastavku ciklične funkcije jajnika kod mlečnih krava [72, 67]. Koncentracije leptina u plazmi kod 20 visoko-mlečnih krava holštajn rase držanih pod uzornim uslovima smanjile su se posle porođaja, dostigle najniži nivo 10,1 2,2 dana posle teljenja, a zatim su se povećale i postale stabilne blizu vremena prve ovulacije 25,9 2,0 dana. Interval od teljenja do prve ovulacije je bio u značajnoj korelaciji sa intervalom od porođaja do najnižeg nivoa leptina, ali nije bio u korelaciji sa vrednostima leptina pre porođaja, pre i/ili posle ovulacije [72]. Drugo istraživanje [67] uključilo je dva različita eksperimenta koji su obavljani sa velikim komercijalnim mlečnim stadima. Nivoi postpartalnog leptina kod krava koje su redovno nastavile cikličnu funkciju jajnika u 35 dana od teljenja upoređeni su sa onima kod kojih je odloženo pojavljivanje cikličnosti (posle 35 dana). Procenat za drugu grupu bio je 31 posto u eksperimentu 2, a 65 posto u eksperimentu 1, možda zbog prejake ishrane ovih krava pre porođaja. Odmah posle teljenja, koncentracije plazma leptina, kao i ocena telesne kondicije bili su skoro isti, bez obzira na buduće trajanje postpartalne acikličnosti. Kod krava u eksperimentu 1 nivoi plazma leptina su varirali u širokom rasponu sa srednjom vrednošću od oko 4 ng/ml prvih jedan do tri dana posle teljenja. Ostali su nepromenjeni do pete sedmice kod krava koje su ovulirale 35. dana, a smanjeni kod onih krava sa odloženim početkom cikličnosti. Kod krava u eksperimentu 2, nivoi leptina prve sedmice bili su niži i manje promenljivi od onih iz eksperimenta 1. Tokom druge i treće sedmice, uočeno je blago povećanje promena u leptinu kod krava koje su nastavile ovarijalnu cikličnost u okviru 35 dana, dok su nivoi leptina ostali nepromenjeni kod onih krava sa odloženim pojavljivanjem cikličnosti. Do pete sedmice, ova tendencija je rezultirala potpuno istim vrednostima leptina kao i kod eksperimenta 1, sa značajnim razlikama između srednjih vrednosti grupa i pete i desete sedmice. U ranim sedmicama laktacije ocena telesne kondicije i telesne mase značajno su se smanjile kod svih životinja, ali je ovo smanjenje bilo očiglednije kod krava kod kojih je odloženo javljanje cikličnosti. U oba eksperimenta, krave sa odloženom pojavom cikličnosti najčešće su imale niže koncentracije glikoze, ukupnog holesterola, nivoa insulina, IGF-I i T_3 i više koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina i OH-butirata, nego one krave koje su ovulirale u okviru 35 dana, mada su ove razlike bile značajne samo tokom prvih sedmica uzorkovanja i bile su izraženije u eksperimentu 1. Nivoi leptina ustanovljeni u različitom vremenu posle teljenja bili su u snažnoj pozitivnoj korelaciji jedni sa drugima, i u korelaciji sa ocenom telesne kondicije odmah posle teljenja i kasnije ponovo tokom desete sedmice, ali ne i pete sedmice. Blaga do umerena pozitivna

korelacija leptina sa insulinom i blaga negativna korelacija sa plazma metabolitima koji se direktno odnose na energetske disbalans (neesterifikovane masne kiseline i OH-butirata) uočeni su od druge sedmice (ali ne u prvih nekoliko dana posle teljenja). Iz ovih podataka može da se zaključi da kod postpartalnih mlečnih krava nivo leptina u plazmi može da utiče na nastavak ciklične funkcije jajnika u prvim sedmicama laktacije, ali taj uticaj može da bude samo kao podstrek (na primer, minimalna koncentracija iznad pretpostavljenog praga izgleda da je predušlov za pojavu cikličnosti). Moglo bi da se pretpostavi da su niži, nego obično, nivoi insulina, IGF-I, leptina i možda T_3 , nepravilan odnos insulin:hormon rasta i/ili njihova kombinacija, mogu da budu činioci koji obaveštavaju osovino hipotalamus – prednji režanj hipofize – jajnik o trenutnom nutricionom statusu i sadržaju telesnih masti. Ovaj signal na hipotalamo-hipofiznom nivou ostvaruje se kao pulsna frekvencija bazalne sekrecije GnRH/LH koja je niža od normalne.

Faktori koji utiču na plodnost postpartalnih mlečnih krava koji su povezani sa energijom

Izgleda da se štetni efekti negativnog energetskeg bilansa tokom rane laktacije odražavaju i u smanjenoj plodnosti tokom postpartalnog perioda osemenjavanja. U uslovima normalnih mlečnih stada, direktna procena energetskeg statusa pojedinačnih krava nije moguća, ali promene u oceni telesne kondicije pružaju indirektnu ocenu. Sa većim gubitkom telesne kondicije, i smanjenje stepena koncepcije je sve izraženije [15]. Krave koje gube jednu ili više jedinica ocene telesne kondicije (na skali od 5) tokom rane laktacije imaju najveći rizik niske plodnosti sa uspehom koncepcije od 17 do 38 posto. Nedavnim istraživanjima je ustanovljeno da su krave ocenjene sa izraženim gubitkom telesne kondicije (1,25 jedinica) imale samo upola mogućnosti za oplođenje kod prve veštačke inseminacije, nego krave sa skromnijim smanjenjem [50]. Nedavna velika studija je ukazala da krave sa ocenom telesne kondicije od 3,0 imaju najveće mogućnosti da koncipiraju pri prvom veštačkom osemenjavanju [81].

• Odložena pojava cikličnosti jajnika

Iako se smanjena plodnost kao posledica negativnog energetskeg bilansa tokom rane laktacije može da objasni produženom acikličnošću kod 30 do 36 posto krava [66, 68, 133, 107, 113, 71], naše razumevanje veza između negativnog energetskeg bilansa i suboptimalnih rezultata koncepcije kod ovulatornih krava ostaje prilično spekulativno. Jedna važna veza između negativnog energetskeg bilansa i smanjene plodnosti je izgleda kroz pomenute efekte na pojavu prve ovulacije posle porođaja. Postoji mnogo podataka o pozitivnom odnosu između rane pojave ovulatornih ciklusa i povećanog oplođenja kod veštačkog osemenjavanja. Krave koje ostaju bez ovulacije duže od 35 do 50 dana tokom lak-

tacije imaju značajno manje izgleda da ostanu steone tokom laktacije i biće isključene iz proizvodnje [68, 22, 42, 20, 29].

- **Bakterijske komplikacije involucije uterusa**

Prihvatajući opštu korist ranog povratka na ovarijalne cikluse posle oplođenja, treba obratiti pažnju na interakciju sa zdravljem uterusa. Krave koje rađaju više od jednog teleta i ovuliraju pre 21. dana posle teljenja pokazale su slabije proizvodne rezultate od onih krava koje ovuliraju kasnije uz visoko pojavljivanje perzistentnih žutih tela [123]. Veruje se da je perzistentno žuto telo rezultat infekcije uterusa i njihova pojava kod mlečnih krava je povećana poslednjih godina [111]. Takođe je uočeno veće pojavljivanje nepravilno skraćenih faza žutog tela [65]. Dokazi o infekciji uterusa i endometritisu jasno su povezani sa smanjenim oplođenjem posle veštačkog osemenjavanja i moraju da se posmatraju kao deo sveukupnog trenda ka manjoj plodnosti visoko mlečnih krava [65, 81, 71, 84].

- **Uticaj nivoa progesterona u cirkulaciji kod već cikličnih krava**

Period pre inseminacije

Još jedna važna veza između negativnog energetskeg bilansa i plodnosti je preneti efekat na koncentracije progesterona u plazmi. Tokom prva dva do tri postpartalna ovulatorna ciklusa najviši nivo progesterona se povećava u krvi od jednog ciklusa do drugog [68, 142, 136, 133], a tokom prvih sedmica laktacije stepen ovog povećanja progesterona je smanjen ili ga je ublažio negativan energetski bilans [142, 130]. Krave sa najizraženijim negativnijim energetskeg statusom tokom prvih 9 dana posle porođaja još uvek su imale smanjene nivoe progesterona u plazmi tokom trećeg estrusnog ciklusa [142] u odnosu na početak perioda osemenjavanja. Koncentracije progesterona u plazmi kod krava odabranih zbog visokog prinosa mleka bile su 25 do 50 posto niže tokom druge i treće lutealne faze nego kod krava iz kontrolne proizvodnje [82].

Postovulatorno povećanje progesterona kod osemenjenih krava

Sposobnost za proizvodnju i održavanje optimalnih koncentracija progesterona važna je za plodnost zbog regulatornog efekta ovog hormona na funkciju endometrija [120]: ustanovljeno je da je plazma progesterona viši 4 do 7 dana posle veštačkog osemenjavanja kod krava koje su gravidne, nego kod onih krava koje nisu [1, 21].

Rana stimulacija progesterona (do 5. dana posle fertilizacije) menja endometrijalnu sekreciju i ubrzava razvoj ploda [46]. Nasuprot tome, manja brzina porasta postovulatornog progesterona tokom četvrtog do petog dana dovedena je u vezu sa smanjenom plodnošću [121, 21] i smanjenim rastom embriona do 16. dana [86]. U ovo kritično vreme za majčino prepoznavanje

trudnoće, nedovoljno razvijen embrion izaziva nedovoljne količine interferona da bi inhibirale uterini luteolitični mehanizam, oslobađanje PGF₂ stimulirano preko oksitocinskog receptora [85], koje samo postaje jače sa nižim progesteronom u cirkulaciji [78]. Osim toga, odloženo povećanje lutealnog progesterona oko četvrtog do petog dana može da omogući prepoznavanje trudnoće i produženu lutealnu funkciju, ali i rani prekid trudnoće zbog toga što je oštećen embrion tokom razvoja [80].

Još uvek nije utvrđen fiziološki mehanizam kojim se negativni energetski bilans rano u postpartalnom periodu pripisuje smanjenoj proizvodnji progesterona dva meseca kasnije. Britt [15] izneo je hipotezu da na ovarijalne folikule štetno utiče izlaganje negativnom energetskom bilansu tokom ranog rasta i razvoja i da bi ovulacija oštećenih folikula mogla da uzrokuje nižu sekreciju progesterona. Ova hipoteza bi mogla da objasni shemu koncentracija progesterona u plazmi kod krava u fazi laktacije, ali moraju da se uzmu u obzir i efekti ishrane na eliminisanje progesterona [64]. Kod ovaca, visok unos energije kroz obrok povećava metaboličko eliminisanje progesterona iz krvi kroz jetru [100]. Ustanovljeno je da je osnovni protok krvi u jetri kod krava u laktaciji dvostruko veći, nego kod krava koje nisu u laktaciji i da se ishranom naglo povećao za 20 do 30 posto [146]. Visok protok krvi u jetri rezultirao je povećanim katabolizmom steroida i 25 posto nižim koncentracijama 17 -estradiola i progesterona u plazmi tokom estrusnog ciklusa, a to je dovedeno u vezu sa većom pojavom degenerativnih embriona petog dana. Tokom rane laktacije, ukupno unošenje hrane kod mlečnih krava dvostruko se povećava do početka perioda osemenjavanja [9]. U ovakvoj situaciji, povišeno eliminisanje progesterona usled visokog dijetetskog unosa (i energije i proteina) može da bude kombinovano sa prenetim efektima negativnog energetskog bilansa i da rezultira u nižim koncentracijama progesterona u plazmi i smanjenoj plodnosti. Uterinska sredina zavisi od progesterona, ali može da postane suboptimalna pod uticajem negativnog energetskog bilansa i povećanim metaboličkim eliminisanjem kod visoko mlečnih krava.

• Kvalitet ovocita

Rani postpartalni negativni energetski bilans može štetno da utiče na ovocite tokom 80 do 100 dana koji su neophodni za razvoj folikula i time da ima još jedan preneti uticaj na plodnost [15]. U nekoliko istraživanja obavljena je aspiracija ovocita transvaginalno iz ovarijalnih folikula tokom perioda od 30 do 120. dana laktacije. Krave koje su jele hranu visoke energetske vrednosti proizvodile su više ovocita, i to boljeg kvaliteta, nego krave koje su imale hranu male energetske vrednosti, ali bilo je samo malo promena tokom perioda sakupljanja kod te dve grupe [75, 55]. Krave koje su imale jači postpartalni negativni energetski bilans usled jače gojaznosti pre i kod teljenja proizvele su ovocite sa nižom sposobnošću za razvoj posle *in vitro* sazrevanja i fertilizacije, u poređenju sa kontrolnim kravama tokom perioda od 80 do 120 dana laktacije [76]. Dalji dokazi o još

više produženom uticaju na razvoj ovocita mogu da se nađu u radovima Snijdersa i sar [124, 125]. Krave visoke genetske vrednosti davale su ovocite sa manjim potencijalom za razvoj nego krave srednje genetske vrednosti u toku srednjeg perioda laktacije (125-229. dana). Razlike u prinosu mleka nisu uticale na razvoj embriona, ali brzina formiranja blastocista bila je smanjena kod krava sa niskom ocenom telesne kondicije (1,5-2,5). Krave visoke genetske vrednosti imale su manju ocenu telesne kondicije od onih krava srednje genetske vrednosti. Predloženo je da je manje uspešna fertilizacija kod krava visoke genetske vrednosti pre rezultat lošeg kvaliteta ovocita, nego trenutnog nivoa bilo kod parametra metabolizma izmerenog u vreme veštačkog osemenjavanja. Sve u svemu, ova iskustva sugerišu opšteštetan uticaj statusa smanjene energije tokom laktacije na razvoj ovocita, ali ostaje nejasno da li su takvi efekti ograničeni u odnosu na vreme koje je potrebno da se folikul razvije.

Zaključak / Conclusion

Reproduktivni rezultati mlečnih krava smanjivali su se tokom poslednjih nekoliko dekada u odnosu na impresivna povećanja prinosa mleka. Zahtevi metabolizma kod visoke proizvodnje mleka rezultiraju većim negativnim energetskim bilansom tokom koga su nivoi glikoze, insulina, IGF-I, leptina i T_3 u krvi uglavnom smanjeni, dok se sadržaj triacilglicerida u jetri i koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (i možda OH-butirat) u plazmi povećavaju. Negativan energetski balans i njegove konsekvence po metabolizam povezane sa postpartalnim razvojem folikula i prvom ovulacijom, variraju koncentracija progesterona u plazmi, koče razvoj ovocita, što uzrokuje smanjenu plodnost. Plodnost mlečnih krava odražava kumulativni efekat metaboličkih, endokrinih i zdravstvenih komponenti koje su modifikovane i prenaplašene selekcijom za visok prinos mleka, kao i izvesnim bolestima (bakterijske komplikacije involucije uterusa, mastitis). Izgleda da je energetski balans najvažniji činilac, ali kompleksne interakcije svih ovih činilaca moraju da se uzmu u obzir i kontrolišu ukoliko želimo da poboljšamo naše razumevanje i da razvijemo nove strategije za poboljšanje plodnosti.

РУССКИЙ

ПОСЛЕРОДОВОЕ ПРОДОЛЖЕНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ, ПЕРВЫЙ ЭСТРУС И ПОВТОРНОЕ ОПОЛОДОТВОРЕНИЕ И ИХ ОТНОШЕНИЕ К МЕТАБОЛИЗМУ ЭНЕРГИИ У ВЫСОКО МОЛОЧНЫХ КОРОВ

Gy. Huszenicza, M. Kulcsar, L. Katai, O. Balogh, X. Шаманц, И. Иванов

В истекших несколько десятилетий замечено постоянное увеличение среднего производства молока у молочных коров кругом мира. В то же самое время, между тем, замечено драматическое уменьшение репродуктивных результатов. Эта тенденция приписана увеличенному явлению бактериальных осложнений в

течение инволюции матки, словно и в большом числе дисфункций яичников в послеродовом периоде. Цель этой работы рассмотреть физиологию и патологию этого другого явления, этого действительно комплексного феномена. Питательная основа этого процесса, что нужды высоко молочных коров резко изменяются после родов, когда дневной выход молока резко увеличивается, а последовательный отрицательный энергетический баланс ОЭБ продолжается на 10-12 недель. В контексте высокой генетической стоимости молочных коров, послеродовой (пр)ОЭБ разница среди диететического вноса используемой энергии и потребления энергии для содержания массы тела и синтеза молока. В принципе, это физиологический феномен, который между тем, может являться результатом в более или менее тяжёлых расстройствах как в метаболизме так и в репродукции, и так может привести и до больших финансовых убытков в современном производстве молока (Rkkwamsuk и сотр., 1999. г.). В первых 3-4 недели после теления, ОЭБ в высокой корреляции и с выходом молока и с интервалом до первой овуляции. Вследствие этого, что показано, что число овуляторных эструальных циклов, предыдущие осеменению (ОС) влияет на степень зачатия, длина пр интервала до первой овуляции обеспечивает важный параметр для оценки эффекта ОЭБ на репродуктивные результаты (Butler, 2000 и 2001).

Ключевые слова: высоко-молочные коровы, метаболизм энергии, после родов, циклическая функция яичников, первый эструс, повторительное оплодотворение

POSTPARTUM RESUMPTION OF CYCLIC OVARIAN FUNCTION, FIRST ESTRUS AND RE-CONCEPTION AND THEIR RELATION TO ENERGY METABOLISM IN HIGH-PRODUCING DAIRY COWS.*

Gy. Huszenicza, M. Kulcsar, L. Katai, O. Balogh, H. Šamanc, I. Ivanov**

In the last few decades a continuous increase was observed in average milk production of dairy cows all over the world. Simultaneously, however, a dramatic decrease was seen in reproductive performance. This tendency is attributed to the increased incidence of bacterial complications in uterine involution, as well as to the high occurrence of ovarian malfunctions in the postpartum period. The aim of this paper is to review the physiology and pathology of the latter, really complex phenomenon. The nutritional basis of this process, that the requirements of high-producing dairy cows shift abruptly after parturition as the daily milk yield rapidly increases and the ensuing negative energy balance (NEB) will extend 10-12 weeks. In the context of the high genetic merit dairy cow, the pp NEB is the difference between the dietary intake of utilizable energy and the expenditure of energy for body mass maintenance and milk synthesis. In principle, it is a physiological phenomenon, which may, however, result in more or less severe disorders in both the metabolism and reproduction and so it may lead to great economic losses in modern dairy practice [112]. In the first 3-4 weeks after calving the NEB is highly correlated with both milk yield and the interval to first ovulation. Because the number of ovulatory estrous cycles preceding the insemination (AI) has been shown to influence the conception rate, the length of the pp interval to first ovulation provides an important parameter for assessing the effect of NEB on reproductive performance [19, 20].

Key words: high-producing dairy cows, energy metabolism, post partus, cyclic ovarian function, first estrus, re-conception

* Rad primljen za štampu 26. 9. 2003. godine

** Gyula Huszenicza, M. Kulcsar, L. K  tai, O. Balogh, Szent Istv  n University, Faculty of Veterinary Science, Budapest, Hungary; dr Horea   amanc, profesor, dr Ivan Ivanov, profesor, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

The pathophysiology of negative energy balance in postpartum dairy cows

• Increased lipid mobilization and its consequences

During the period of NEB high-producing cows have to mobilize their body reserves, first of all their subcutaneous lipid stores (*increased or forced lipid mobilization*, FLM). Generally the animals overfed before calving [body condition score (BCS) at calving: 3.75] are in the most endangered position (*fat cow syndrome*). The rapid reduction in body weight (BW) and BCS are the most obvious clinical symptoms of FLM. As an early consequence, a sharp elevation can be seen in circulating levels of non-esterified fatty acids (NEFA), which is followed – quite frequently, but not in all of the cases – by increased production of OH-butyrate (BHB) and other ketone bodies (*hyperketonaemia*). Simultaneously lipids, mainly triacylglycerols (TAG) are accumulated in the liver (*fatty liver disease*). The moderate to severe forms of fatty liver (fat content: 20 %) may result in well-defined disorders in hepatocellular functions (gluconeogenesis, cholesterol, bile acid and bilirubin metabolism, inactivation of steroid hormones and insulin, synthesis of certain apolipoproteins and the 25-hydroxylation of cholecalciferol). The clearance of bromosulphothalein becomes markedly slower and the concentrations of *total bilirubin* and *total bile acids* in plasma are positively correlated with the degree of fatty infiltration in hepatocytes. Simultaneously *hypoalbuminaemia*, obviously reduced levels of *very low density lipoproteins* and *low density lipoproteins*, furthermore lower than normal concentrations of all the *lipoprotein-transported substances* (*total cholesterol*, TAG, β -carotene and tocopherol) can be detected in the peripheral blood. Although the membrane damaging effect of fatty infiltration is not obvious, moderate increases are usually observed in serum activities of *aspartate aminotransferase*, *alkaline phosphatase* and *lactate dehydrogenase*. In the more severe forms of hepatic lipidosis the hepatocellular detoxifying capacity of ruminal *ammonia* as well as of *endotoxin* absorbed from the gastrointestinal tract or liberated from any endotoxin-mediated diseases including the acute putrid (endo)metritis (APE), or certain forms of mastitis is diminished. Also the impairment of the immune system has been reported to occur, which is known to make the affected individual susceptible to bacterial complications of uterine involution (APE), as well as to *mastitis*. The FLM-induced biochemical changes predispose the cow for *retained fetal membrane*, *milk fever*, and *displaced abomasum*, as well as for various forms of *ketosis*. This latter disease is a direct consequence of NEB and FLM. The liver markedly increases its NEFA uptake from the blood. These fatty acids are either esterified to TAG, or converted into acetyl-CoA. Whether this acetyl-CoA is introduced into the Krebs cycle depends on the availability of oxaloacetate, which is predominantly delivered from gluconeogenetic

precursors such as propionate, pyruvate, glycerol, or certain amino acids. If the supply of these precursors is inadequate, as can occur frequently during NEB, the availability of oxaloacetate for introducing acetyl-CoA into the Krebs cycle decreases. The excess acetyl-CoA is then used for ketogenesis and the cow can develop subclinical or clinical forms of ketosis. An inadequate supply with gluconeogenic precursors seems to be the core event in this process [94, 95, 44, 45, 57, 54, 59, 106, 56, 28, 77, 49, 105, 89, 48, 144, 5, 16, 88, 139, 73, 137, 112, 113].

• The endocrinology of negative energy balance

The pp NEB can induce marked endocrine changes, which are known as important factors in regulation of FLM. Beside the involvement of *chatecolamines*, elevated glucagon and decreased insulin concentrations characterize the earliest changes, whereas the *growth hormone* (GH) level remains unchanged or perhaps slightly increases. Simultaneously the *GH-induced hepatic insulin-like growth factor-1* (IGF-1) liberation and the *glucagon-induced insulin responsiveness of pancreatic β -islets* are diminished and certain tissues lose their insulin sensitivity. All these endocrine events can shift the metabolism from an anabolic to the catabolic state [110, 109, 61, 130, 128, 90, 30, 58, 60, 136, 39, 115, 148, 50, 134, 108]. This metabolic shift may be amplified by the endocrine consequences of a simultaneous endotoxin exposure [38, 37, 70]. The peripheral tissues try to fit their current local energy metabolism to this new, NEB-induced catabolic condition through increasing the capacity of an inactivating [3,3',5'-triiodothyronine (rT_3) producing] path of thyroid hormones [thyroxine (T_4) and 3,3',5-triiodothyronine (T_3)]. So although the thyrotropin releasing hormone (or thyrotropin) induced T_4 response of the thyroid gland is only slightly altered, obviously decreased T_4 and T_3 levels and elevated rT_3 concentrations are reported to occur in the peripheral blood [26, 17, 101, 103, 109, 140, 141, 58, 99, 138]. The involvement of adrenocortical function / cortisol production was also supposed a long time ago, however, since then no existing experimental evidence has been found to confirm this hypothesis. Recently, the research on regulation of feed intake and energy metabolism has been focused on the supposed role of *leptin*. This newly identified 16 kDa cytokine like protein hormone is secreted mainly by the adipose tissue, and is believed to act through hypothalamic nerve centers in mediation of neuroendocrine responses to energy supply or deprivation. It may signal nutritional status perhaps also for the peripheral organs. This hormone is one of the primary agents communicating information about the level of peripheral energy stores to brain regions concerned with orchestrating feeding behavior, metabolism, and endocrine function so as to maintain energy homeostasis [150, 43, 68, 63]. In mice, rats, humans and also in ruminants and pig its circulating concentration may vary directly with changes in BW and percentage of body fat and leptin contributes to the regulation of body fat content. Insulin, glucocorticoids and endotoxin exposure may increase its gene expression and/or plasma level, whereas

leptin can directly inhibit cortisol synthesis by adrenal cells. So leptin and cortisol interact in a negative feedback loop. The 24-h incubation with T₃ (but not with T₄) significantly increased the expression of leptin mRNA and the levels of secreted leptin in adipocyte cultures. The leptin liberation from adipocytes is down-regulated by adrenergic stimulation and it is also supposed to interact with growth hormone and IGF-I secretion [27, 24, 62, 63, 8, 7, 41, 74, 25, 69]. Multi-species, and later species-specific assay systems allowing the exact quantification of plasma leptin in various domestic mammals were developed only in the late nineties and at the beginning of this decade. Since then an increasing body of information has been available suggesting that leptin may be associated with NEB also in ruminants including cattle [14, 24, 92, 4, 31, 36, 72, 13, 25, 69].

Ovarian function and negative energy balance in postpartum dairy cows

• Resumption of regular follicular growth. Onset of ovarian cyclicity

In almost the entire non-suckling dairy cows the FSH concentrations in plasma increase to peak values on d 4-5 after calving. This first FSH peak is followed immediately by the initiation of the first pp follicular wave producing the first dominant [>9 mm] follicle (DF). Subsequently the regular formation of new FSH waves followed by growing of new follicular cohorts and producing new DF-s is reported to proceed despite the average NEB of -7.5 Mcal/day during the first 3-week period after calving [10]. It appears that the initiation of follicular waves in early pp cows is unperturbed by NEB and occurs in response to the re-establishment of periodic FSH surges synchronized only by the end of gestation and parturition. During the NEB in early weeks of lactation LH, but not FSH appears to be deficient. Therefore regular onset of FSH dependent follicular growth seems to be insensitive to NEB [79, 116, 104, 10, 12]. The steroidogenic capability of the first DF formed during the second week after calving, as well as the factors influencing its fate, however, require further studies.

Three patterns of pp follicular development based on the fate of the first DF have been described [116, 104, 10, 11, 12]: (1) *ovulation* of the first-wave DF; (2) development of a first-wave *anovulatory* DF followed by (several other) additional waves of follicular development before the first ovulation; (3) development of a first-wave DF that becomes *cystic*. Patterns 1 (ovulatory) and 3 (cystic) are characterized by development of 17 β -estradiol (E₂) producing (estrogen-active) DF, whereas pattern 2 is characterized by growth of DF that produce only low peripheral concentrations of E₂ and become atretic. In the case of pattern 1 the ovarian activity becomes cyclic after the ovulation of the first-wave DF. Patterns 2 and 3 may be repeated several times, so both the regression of the (first-wave and subsequent) DF(s) and the formation of anovulatory cysts can prolong the interval to first pp. ovulation (*pp. acyclic period*). Since the early eighties it has been widely

accepted that the EB is one of the most important factors influencing the duration of this acyclic period: in non-suckling dairy cows the first pp. ovulation takes place on about the 10th d after the nadir of NEB [18, 22].

There are only few studies available in literature which examined the direct relationship between NEB and follicular dynamics in pp. dairy cows. Lucy *et al.* (1991) demonstrated that the number of class 3 (10-15 mm in diameter) – but not of the classes 1 (3-5 mm) and 2 (6-9 mm) – follicles increased with more positive energy balance (EB) before d 25 after calving. This observation suggests that as cows improve in EB, the movement of smaller follicles into larger size classes is enhanced. During the first pp follicular wave (d 8-14 after calving) in cows receiving three levels of dietary fat, the number of class 1 and class 2 follicles was not correlated with EB during either the 1st or 2nd wk pp, regardless of diet [11]. The development of a DF in pp dairy cows is tolerant to NEB. However, several studies demonstrated that the ultimate diameter and E₂ production of DF are influenced by metabolic factors: both of the size of DF and the E₂ level in plasma increased after EB improved from its most negative level [10, 11].

• Metabolic and endocrine signaling mechanisms

The effect of NEB on the time of the first pp ovulation was confirmed a relatively long time ago [18, 22]. However, the physiological signaling mechanisms informing the *hypothalamus - anterior pituitary - ovary* (HPO) axis on the current stage of EB have remained open for a while, and perhaps some details are questionable even nowadays. The restricted energy intake did not alter the pituitary GnRH receptor density in pp cows [96], but dietary energy restrictions were followed by both decreased [114] and increased [145] responsiveness to exogenous GnRH. The loss of pulsatile LH secretion was shown to result from prolonged inadequacy of energy supply in both of suckling beef cows, and non-suckling dairy cows [79, 23, 102]. Up to now it has been widely accepted that the re-establishment of a pulsatile LH secretion pattern conducive to preovulatory follicular development and function is a key event in the return of ovarian cyclicity in pp dairy cows experiencing NEB [12]. It appears, that pp recovery of pituitary LH content and responsiveness to GnRH is complete by d 10 after calving in dairy cows, and available evidence across species suggests a predominantly hypothalamic locus for the primary effect of decreased energy intake [96, 117]. In the early weeks of lactation the reduced activity of the GnRH pulse generator in pp dairy cows is expressed as reduced pulsatile LH support of follicular steroidogenesis necessary for induction of a preovulatory like LH surge and subsequent ovulation. However, a seemingly low LH pulse frequency (2 pulses per 6 h) is apparently adequate to sustain the morphological development of DF by the 2nd wk pp. This observation is consistent with the growth and differentiation of competent DF-s during the mid-luteal phase of the bovine estrous cycle when the LH pulse frequency is low [33].

Studies investigating the potential metabolic signals for the HPO axis have been focused primarily on blood metabolites (NEFA, glucose) and metabolic hormones (insulin:GH ratio, insulin, IGF-I) known to fluctuate during altered states of energy metabolism. Concerning the NEFA and glucose, however, quite contradictory observations were reported [66, 23, 50]. So it is generally accepted nowadays that any mechanism coupling metabolic status with HPO has to involve ultimately a hormonal component [12]. Studies of *Beam and Butler* [10, 11] confirmed the physiological importance of plasma insulin:GH ratio and the day of the EB nadir, indicating that these hormonal differences in the intermediate pp period may influence the first wave follicular function. Insulin has been shown to stimulate follicular cells *in vitro* also in cows [127] and small increases pp could have important effects during the very early stages of follicular development. Circulating concentrations of IGF-I and one of its binding proteins (IGFBP-2) in the peri-parturient period were good indicators of the capacity of energy-restricted cows to resume cycling after calving [108]. Furthermore, an increased insulin:GH ratio following parturition may be conducive to greater hepatic IGF-I production [91], resulting in increased amounts of this growth factor earlier after calving. Although some seemingly contradictory observations have also been reported in heifers [128], during the first 2 weeks pp *Beam and Butler* [10, 11] could detect significantly higher circulating IGF-I concentration in cows developing E₂-active, ovulatory first-wave DF than in those with E₂-inactive anovulatory first-wave DF. In cows the circulating IGF-I concentrations correlated with IGF-I levels in the follicular fluid of large follicles [34]. Both insulin and IGF-I are known to stimulate the *in vitro* steroidogenesis and proliferation of bovine thecal and granulosa cell cultures [127, 129]. Under *in vitro* conditions in bovine thecal cells the IGF-I increased the number of LH-binding sites and enhanced the LH-induced production of androstenedione and progesterone [129]. This finding confirms the *in vivo* observation of *Beam and Butler* [11] demonstrating an apparent relationship between the steroidogenic activity of first-wave DF and circulating levels of IGF-I. In human and porcine granulosa cell cultures the T₃ could also increase the estrogen-producing aromatase activity and E₂ yielding [87, 52, 143, 53]. Up to now there is only one study evaluating the effect of T₃ and T₄ on steroidogenesis of ovarian cells in cattle: *Spicer et al.* (2001) reported a direct stimulatory effect of T₃ and T₄ on thecal cell steroidogenesis. The stimulatory effect of T₃ and T₄ on androstenedione production (i.e., increases to two- to fourfold) was similar to the influence of LH on androstenedione production (i.e. increases to 4- to 9-fold). The stimulatory effect of T₃ was biphasic (i.e., low dose stimulated, high dose had no effect), however the influence of T₄ was similar at both doses. In contrast, T₃ inhibited hCG-induced androgen secretion by porcine thecal cells [53]. Thus, species differences and/or differences in culture conditions may exist with regard to thyroid hormone regulation of thecal steroidogenesis, as for granulosa cell steroidogenesis. In cattle the T₄ was a much weaker (i.e., increase to 1.3-fold) inducer of thecal cell P₄ production than was LH (i.e., increases to four- to ninefold) and its effect was only evident

at hyperthyroid levels (i.e., 100 ng/ml, but not 30 ng/ml); T_3 had no effect on granulosa and thecal cell P_4 production in this study (Spicer *et al.*, 2001). The association between low E_2 , negative energy balance, and low T_3 was also found in young women distance runners [149]. In contrast, diameters of dominant follicles from multiparous Brahman cows were not affected by induced hypothyroidism [32].

Through affecting the hypothalamic GnRH and pituitary gonadotrop secretions also the *leptin* has been reported to influence the genital functions in rodents, primates and recently also in ruminants. Experiences have confirmed that this hormone may be one of the long-sought indicators of nutritional status that allows reproductive processes to proceed. Results in rodents, non-human primates and also in ewes suggest that the suppression of GnRH / LH during fasting is mediated by central action of leptin in the pituitary or the brain [40, 97, 98, 93, 122]. Moreover, Ahima *et al.*, [2] showed that treatment with leptin accelerates puberty in normal mice at doses that do not change body weight, and suggested that actions of leptin to regulate neuroendocrine and reproductive function in normal mice are not secondary to effects on energy balance. Low leptin induced markedly increased production of neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamus [1], and increased NPY inhibited the gonadal axis in lab rodents and also in ruminants, so it has been postulated that impaired reproductive function in adverse metabolic condition such as fasting could be due to excessive hypothalamic NPY release [47, 118]. Several observations suggest that leptin is an important biochemical message between fat stores and the reproductive axis [1, 6, 2, 41]. Leptin receptors have been detected also in gonads. Under in vitro conditions leptin has weak inhibitory effects on gonadotropin- and/or IGF-I-induced steroidogenesis of thecal and granulosa cells [128]. In conclusion, not only the hypo-, but also the hyperleptinemia can be supposed to have a negative influence on reproduction in domestic mammals including cattle [122].

In *periparturient dairy cows*, changes in the plasma concentration of leptin have been measured during the period from 35 d before to 56 d after parturition. The plasma concentration of leptin was highest during late pregnancy and declined by 50% after parturition. The plasma leptin concentration remained depressed during early lactation despite a gradual improvement in energy balance. Corresponding changes occurred in the abundance of leptin mRNA in subcutaneous white adipose tissue. The pp reduction in plasma leptin was due to the NEB because plasma leptin remained high in cows not milked after parturition. The plasma concentration of leptin was positively correlated with plasma concentrations of insulin and glucose, and negatively correlated with plasma concentrations of GH and NEFA [13]. There are only limited data available on the interrelation between circulating leptin levels and pp resumption of cyclic ovarian function in dairy cows [72, 67]. In 20 high-producing Holstein cows kept under model conditions the plasma leptin concentrations declined after parturition, reached their nadir on 10.1 ± 2.2 days after calving, then they increased and became stable near

the time of the first ovulation on 25.9 ± 2.0 days. The interval from calving to first ovulation correlated significantly with the interval from parturition to leptin nadir, but it was not in correlation with the prepartum, pre- and/or postovulatory leptin values [72]. The other trial [67] involved two separate experiments, which were conducted in commercial large-scale dairy herds. The pp leptin levels of cows resuming their cyclic ovarian function regularly within 35 days after calving were compared to those with delayed (after 35 days) onset of cyclicity. The rate of the latter group was 31 % in the *Exp. 2*, but 65 % in the *Exp. 1*, perhaps due to the prepartum overfeeding of these cows. Immediately after calving the plasma leptin concentrations, as well as the BCS of cows were almost the same, regardless of the forthcoming duration of pp acyclicity. In cows of *Exp. 1* the plasma leptin levels varied within a wide range with a mean of about 4 ng/ml on the first 1-3 days after calving. Up to week 5 they remained unchanged in cows ovulated within day 35, but reduced in those with a delayed onset of cyclicity. In cows of *Exp. 2* the week 1 leptin levels were lower and less variable than those of *Exp. 1*. In weeks 2 and 3 a slightly increasing tendency of leptin pattern was seen in cows resuming their ovarian cyclicity within 35 days whereas in those with delayed onset of cyclicity the leptin level remained unchanged. Up to week 5 this tendency resulted in exactly the same leptin values as seen in *Exp. 1* with significant differences between the group means in both of the weeks 5 and 10. In the early weeks of lactation the BCS and BW decreased significantly in all animals, but this reduction was more obvious in cows with a delayed onset of cyclicity. In both experiments the cows with delayed onset of cyclicity were usually characterized by lower glucose, total cholesterol, insulin, IGF-1 and T₃ levels and higher NEFA and BHB concentrations than those that ovulated within 35 days, although these differences were significant only in the early weeks of sampling and were more obvious in *Exp. 1*. The leptin levels determined at various times after calving were in strong positive correlation with each other, and correlated with BCS immediately after calving and later again in week 10, but not in week 5. Mild to moderate positive correlation of leptin with insulin and mild negative correlation with plasma metabolites related directly to energy imbalance (NEFA, BHB) were seen from week 2 (but not in the first few days after calving). Concluding these data in pp dairy cows the plasma level of leptin may interfere with the resumption of cyclic ovarian function in the early weeks of lactation, but its influence may be only permissive (e.g. a minimal concentration above a supposed threshold seems to be the prerequisite of the onset for cyclicity). It may be suggested that the lower than normal insulin, IGF-1, leptin and perhaps T₃ levels, the incorrect insulin:GH ratio and/or their combination may be the factors informing the HPO axis on the current nutritional status and body fat content. At the hypothalamic-pituitary level this signal is realized as lower than normal pulse frequency of basal GnRH / LH secretion.

Energy related factors influencing fertility in postpartum dairy cows

The detrimental effects of NEB in early lactation appear to be manifested also as reduced fertility during the pp breeding period. In normal dairy herd situations direct assessment of energy balance in individual cows is not possible, but changes in BCS provide an indirect measure. With more extensive loss of BCS, the reduction in conception rate becomes greater [15]. Cows losing one unit or more BCS (5 point scale) during early lactation are at the greatest risk for low fertility with conception rates of 17 to 38 %. Recent studies indicated that cows with marked losses in BCS (≥ 1.25 unit) were only half as likely to conceive at first AI as cows with more modest loss [51], and that the conception rate increases 10 % for every unit increase in BCS [135]. A recent large survey study found that cows with a BCS of 3.0 at the first AI were most likely to become pregnant [81].

- **Delayed onset of ovarian cyclicity**

Although reduced fertility as a consequence of NEB in early lactation may be explained by prolonged acyclicity in 30 - 36 % of cows [66, 68, 133, 107, 113, 71], our understanding of the linkage between NEB and sub-optimum conception rates in ovulatory cyclic cows remains rather speculative. One important link between NEB and lower fertility appears to be through the aforementioned effects on the timing of first postpartum ovulation. A positive association between the early commencement of ovulatory cycles and the improved conception rate to AI is well documented. Cows remaining anovulatory for 35-50 days of lactation were significantly less likely to become pregnant during lactation and would be culled [68, 22, 42, 20, 29].

- **Bacterial complications of uterine involution**

While accepting the general benefit of an early return to ovarian cycles on fertility, we should be mindful of the interaction with uterine health. Multiparous cows ovulating before 21 days postpartum exhibited poorer reproductive performance than those ovulating later in association with a high incidence of persistent corpora lutea (CLP) [123]. CLP presumably result from uterine infection and their incidence in dairy cows has increased in recent years [111]. Also a higher rate of irregularly shortened CL phases was reported to occur [65]. Evidence of uterine infection and endometritis are clearly associated with reduced fertility to AI, and must be considered part of the overall trend for lower fertility in high yielding cows [65, 81, 71, 84].

- **The effect of circulating progesterone level in already cyclic cows**

Pre-insemination period

Another important link between NEB and fertility is the carryover effect on plasma P_4 concentrations. During the first two or three pp ovulatory cycles the peak level of P_4 is reported to increase in the blood from one cycle to the next [68, 142, 136, 133], and in the early weeks of lactation the rate of this P_4 increase is reduced or moderated by NEB [142, 130]. Cows with the most negative energy status during the first 9 days postpartum still had decreased plasma P_4 levels during their third estrus cycles [142] corresponding to the start of the breeding period. Plasma P_4 concentrations in cows selected for high milk yield were 25 to 50% lower during the second and third luteal phase than in control line cows [82].

Post-ovulatory rise of progesterone in inseminated cows

The ability to produce and maintain optimum P_4 concentrations is important for fertility due to the regulatory effect of this hormone on endometrial function [120]: by 4-7 days after AI the plasma P_4 was found to be higher in cows that became pregnant than in non-pregnant cows [1, 21].

Early (by day 5 after fertilization) P_4 stimulation alters endometrial secretions and advances conceptus development [46]. Conversely, a slower rate of post-ovulatory P_4 rise through days 4-5 has been associated with lower fertility [121, 21] and decreased embryo growth by day 16 [86]. At this critical time for maternal recognition of pregnancy an inadequately developed embryo produces insufficient quantities of interferon- γ to inhibit the uterine luteolytic mechanism, the oxytocin receptor stimulated PGF_2 release [85], which in itself is made stronger by lower circulating P_4 [78]. In addition, a delayed rise in luteal P_4 around days 4-5 may allow pregnancy recognition and extended luteal function, but early termination of the pregnancy because the embryo has been compromised during development [80].

The physiological mechanism by which NEB early in the pp period translates into reduced P_4 production two months later has not been established. Britt [15] hypothesized that ovarian follicles are detrimentally affected by exposure to NEB during their early growth and development and that ovulation of affected follicles would lead to lower P_4 secretion. This hypothesis may explain the pattern of plasma P_4 concentrations in lactating cows, however, the effects of dietary intake on P_4 clearance must also be considered [64]. In sheep, high dietary energy intake increases metabolic clearance of P_4 from blood by the liver [100]. The baseline liver blood flow in lactating cows was found to be twice that in non-lactating cows and was acutely increased 20-30% with feeding [146]. High liver blood flow resulted in increased steroid metabolism and 25% lower plasma E_2 and P_4 concentrations during the estrous cycle and this was associated with a higher incidence of degenerating embryos on day 5. During early lactation total dietary intake in dairy cows increases two-fold by the beginning of the breeding

period [9]. In this situation increases in P_4 clearance due to high dietary intake (both energy and protein) may be combined with the carryover effects of NEB to result in lower plasma P_4 concentrations and to reduce fertility. The uterine environment is dependent on P_4 , but may be rendered sub-optimum by effects of NEB and increased metabolic clearance in high yielding cows.

- **The quality of oocytes**

Early pp NEB may adversely impact oocytes during the 80-100 days required for follicle development and, thereby, exert another carryover effect on fertility [15]. Several studies have aspirated oocytes transvaginally from ovarian follicles over the period of 30-120 days of lactation. Cows on high energy diets produced more oocytes and oocytes of higher quality than cows on low energy diets, but there were only modest changes over the collection period in both groups [75, 55]. Cows having more severe pp NEB due to over-fatness before and at calving, produced oocytes with lower developmental capacity following in vitro maturation and fertilization procedures as compared with control cows during the period of 80-120 days of lactation [76]. Further evidence for an even more prolonged effect on oocyte development comes from the study of *Snijders et al.* [124, 125]. High genetic merit cows yielded oocytes with lower developmental potential than medium genetic merit cows during mid-lactation (125-229 days). Differences in milk yield did not affect embryo development, but blastocyst formation rates were reduced in cows with low BCS (1.5-2.5). High genetic merit cows had lower BCS than medium merit cows. Lower conception rates for the high genetic merit cows were suggested to be the result of impaired oocyte quality rather than the currently existing level of any of the metabolic parameters measured at the time of AI studied. Overall, these experiences suggest a generally adverse effect of reduced energy status during lactation on oocyte development, but whether such effects are limited in relation to the time required for follicle development remains unclear.

Conclusion / Zaključak

Reproductive performance in dairy cows has declined over the past several decades in association with impressive increases in milk yields. The metabolic demands of high milk production result in greater NEB, during which blood levels of glucose, insulin, IGF-I, leptin and T_3 levels are generally reduced, while TAG content in the liver and plasma NEFA (and perhaps BHB) concentrations are increased. NEB and its metabolic consequences are associated with pp follicular development and first ovulation, variability of plasma P_4 concentrations, and impair oocyte development, resulting in decreased fertility. Fertility in dairy cows reflects the cumulative influence of metabolic, endocrine, and health components that have been modified and exaggerated by selection for high milk yield, as well

as by certain diseases (bacterial complications of uterine involution, mastitis). EB seems the most important factor, but the complex interactions of all these factors must be considered and controlled if we are to improve our understanding and develop new strategies to improve fertility.

Abbreviation key: AI = artificial insemination; APE = acute putrid (endo)metritis; BCS = body condition score; BHB = β OH-butyrate; BW = body weight; CL = corpus luteum; CLP = corpus luteum persistency; DF = dominant follicle; E_2 = 17 β -estradiol; EB = energy balance; FLM = forced lipid mobilization; FSH = follicle stimulating hormone; GH = growth hormone; GnRH = gonadotrop releasing hormone; HPO axis = hypothalamus - anterior pituitary - ovary axis; IGFBP-1 to 5 = insulin-like growth factor binding protein-1 to 5; IGF-I = insulin-like growth factor-I (syn.: somatomedin C); LH = luteinizing hormone; mRNA = messenger ribonucleic acid; NEB = negative energy balance; NEFA = non-esterified fatty acids; NPY = neuropeptid Y; P_4 = progesterone; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandin $F_{2\alpha}$; pp = postpartum; RFM = retained fetal membrane; rT_3 = 3,3',5'-triiodothyronine; T_3 = 3,3',5'-triiodothyronine; T_4 = thyroxine; TAG = triacylglycerols

Literatura / References

1. Ahima R. S., Prabakaran D., Mantzoros C. Qu, D., Maratos-Flier E, Flier J. S.: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-252, 1996. - 2. Ahima R. S., Dushay J., Flier J. S., Prabakaran D., Flier J. S.: Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J. Clin. Invest.* 99, 391-395, 1997. - 3. Ahmad N. S., Beam W., Butler W. R., Deaver D. R., Duby R. T., Elder D. R., Fortune J. E., Griel L. C., Jones L. S., Milvae R. A., Pate J. L., Revah I., Schreiber D. T., Townson D. H., Tsang P. C. W., Inskeep E. K.: Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci.* 74, 1943- 1952, 1996. - 4. Amstalden M., Garcia M. R., Williams S. W., Stanko R. L., Nizielski S. E., Morrison C. D., Keisler D. H., Williams G. L.: Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor-I. *Biol. Reprod.* 63, 127-133, 2000. - 5. Andrews A. H., Laven R., Maisey I.: Treatment and control of an outbreak of fat cow syndrome in a large dairy herd. *Vet. Rec.* 129, 216-219, 1991. - 6. Barash I. A., Cheung C. C., Weigle D. S., Ren H., Kabigting E. B., Kuijper J. L., Clifton D.K. Steiner R. A.: Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinol.* 137, 3144-3147, 1996. - 7. Barb C. R.: The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *J. Anim. Sci.* 77, 1249-1257, 1999. - 8. Barb C. R., Barrett J. B., Kreamling R. R., Rampacek G. B.: Role of leptin in modulating neuroendocrine function: a metabolic link between the brain, pituitary and adipose tissue. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 111-125, 1999. - 9. Bauman D. E., Currie W. B.: Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63, 1514-1529, 1980. - 10. Beam S. W., Butler W. R.: Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133-142, 1997. - 11. Beam S. W., Butler W. R.: Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.* 81, 121-131, 1998. - 12. Beam S. W., Butler W. R.: Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cow. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54, 411- 424, 1999. - 13. Block S. S., Butler W. R., Ehrhardt R. A., Bell A. W., Van Amburg M. E., Boisclair Y. R.: Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinology*, 171, 341-50, 2001. - 14. Bocquier F., Bonnet M., Faulconnier Y., Guerre-Millo M., Martin P. Chillard Y.: Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose

tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 489-498, 1998. - 15. Britt J. H.: Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. *Proceedings of the XVII World Buiatrics Congress*, St. Paul, MN, Vol. 2, 143-149, 1992. - 16. Bruss M. L.: Metabolic fatty liver of ruminants. In: Cornelius, C.E. (ed) *Advances in veterinary science and comparative medicine*. San Diego, Academic Press Inc. 421-422, 1993. - 17. Burman K. D., Smallridge R. C., Osburne R., Diamond R. C., Whorton N. E., Kesler P., Wartofsky L.: Nature of suppressed TSH secretion during undernutrition: effect of fasting and re-feeding on TSH response to prolonged TRH infusion. *Metabolism* 29, 46-52, 1980. - 18. Butler W. R., Everett R. W., Coppock C. E.: The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 53, 742-748, 1981. - 19. Butler W. R.: Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 449-457, 2000. - 20. Butler W. R.: Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. In: Diskin, M.G. (ed.): *Fertility in the high-producing dairy cow*. British Society of Animal Science, Edinburgh, Occasional publications, 26, 1, 133-145, 2001. - 21. Butler W. R., Calaman J. J., Beam S. W.: Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74, 858-865, 1996. - 22. Butler W. R., Smith R. D.: Inter-relationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72, 767-783, 1989. - 23. Canfield R. W., Butler W. R.: Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69, 740-746, 1991. - 24. Chilliard Y., Bocquier F., Delavaud C., Guerre-Millo M., Bonnet M., Martin P., Faulconnier Y., Ferlay A.: Leptin in ruminants: effects of species, breed, adiposity, photoperiod, beta-agonists and nutritional status. *Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers* (Rochester Marriott Thruway Hotel, Rochester, NY), The Cornell University, 65-74, 1998. - 25. Chilliard Y., Bonnet M., Delavaud C., Faulconnier Y., Leroux C., Djiane J., Bocquier F.: Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Dom. Anim. Endocr.* 21, 271-295, 2001. - 26. Chopra J., Chopra V., Smith S. R.: Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3) in systemic illnesses. *J. Clin. Metab.* 41, 1043-1047, 1975. - 27. Considine R. V., Caro J. F.: Leptin and the regulation of body weight. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1255-1272, 1997. - 28. Curtis C. R., Erb H. N., Sniffen C. J., Smith R. D., Kronfeld D. S.: Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 68, 2347-2360, 1985. - 29. Darwash A. O., Lammung G. E., Royal M. D.: A protocol for initiating oestrus and ovulation early postpartum in dairy cows. *Anim. Sci.* 72, 539-546, 2001. - 30. De La Sota R. L., Lucy M. C., Staples C. R., Thatcher W. W.: Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and non-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1002-1013, 1993. - 31. Delavaud C., Bocquier F., Chilliard Y., Keisler D. H., Gertler A., Kann G.: Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentrations assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinology*, 165, 519-526, 2000. - 32. DeMoraes G. V., Vera-Avila H. R., Lewis A. W., Koch J. W., Neuendorff D. A., Hallford D. M., Reeves J. J., Randel R. D.: Influence of hypo- or hyperthyroidism on ovarian function in Brahman cows. *J. Anim. Sci.* 76, 871- 876, 1998. - 33. Driancourt M. A., Thatcher W. W., Terqui M., Andrieu D.: Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrus cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom. Anim. Endocr.* 8, 209-221, 1991. - 34. Echternkamp S. E., Spicer L. J., Gregory K. E., Canning S. F., Hammond J. M.: Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43, 8 -14, 1990. - 35. Edqvist L.-E., Forsberg M.: Clinical reproductive endocrinology. In: Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. (eds) *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, San Diego, London, Boston, pp. 598-618, 1997. - 36. Ehrhardt R. A., Slepatis R. M., Siegal-Willott J., Van Amburgh M. E., Bell A. W., Boisclair Y. R.: Development of a specific radioim-

radioassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. J. Endocrinology, 166, 519-528, 2000. - 37. Elsasser T. H., Caperna T. J., Rumsey T. S.: Endotoxin administration decreases plasma insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-2 in Angus x Hereford steers independent of changes in nutritional intake. J. Endocrinology, 144, 109-117, 1995. - 38. Elsasser T. H., Fayer R., Rumsey T. S., Hartnell G. F.: Recombinant bovine somatotropin blunts plasma tumor necrosis factor- α , cortisol and thromboxane-B2 responses to endotoxin in vivo. Endocrinology, 134, 1082-1088, 1994. - 39. Eppard P. J., Veenhuizen J. J., Cole W. J., Commens-Keller P. G., Hartnell G. F., Hintz R. L., Munyakazi L., Olsson P. K., Sorbet R. H., White T. C., Baile C. A., Collier R. J., Goff J. P., Horst R. L.: Effect of bovine somatotropin administered to periparturient dairy cows on the incidence of metabolic disease. J. Dairy Sci. 79, 2170-2181, 1996. - 40. Finn P. D., Cunningham M. J., Pau K. Y. F., Spies H. G., Clifton D. K., Steiner R. A.: The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. Endocrinology, 139, 4652-4662, 1998. - 41. Foster D. L., Nagatani S.: Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. Biol. Reprod. 60, 205-215, 1999. - 42. Frajblat M.: Metabolic state and follicular development in the postpartum lactating dairy cow. Ph.D. dissertation. Cornell University, Ithaca, 2000. - 43. Friedman J. M., Halaas J. L.: Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395, 763-770, 1998. - 44. Fronk T. J., Schultz L. H., Hardie A. R.: Effect of dry period overconditioning on subsequent metabolic disorders and performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 63, 1080-1090, 1980. - 45. Garnsworthy P. C., Topps J. H.: The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. Anim. Prod. 35, 113-119, 1982. - 46. Garrett J. E., Geisert R. D., Zavy M. T., Morgan G. L.: Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J. Reprod. Fertil. 84, 437-446, 1988. - 47. Gazal, O. S., Leshin, L. S., Stanko, R. L., Thomas, M. G., Keisler, D. H., Anderson, L. L., Williams, G. L.: Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. Biol. Reprod., 59, 676-683, 1998. - 48. Gerhart M. A., Curtis C. R., Erb H. N., Smith R. D., Sniffen C. J., Chase L. E., Cooper M. D.: Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. J. Dairy Sci. 73, 3132-3140, 1990. - 49. Gerloff B. J., Herdt T. H., Emery R. S.: Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188, 845-850, 1986. - 50. Giger R., Faissler D., Busato A., Blum J., Kupfer U.: Blutparameter während der Frühlaktation in Beziehung zur Ovarfunktion bei Milchkühen. Reprod. Dom. Anim. 32, 313-319, 1997. - 51. Gillund P., Reksen O., Gröhn Y. T., Karlberg K.: Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. J. Dairy Sci. 84, 1390-1396, 2001. - 52. Goldman S., Dirnfeld M., Abramovici H., Kraiem Z.: Triiodothyronine (T3) modulates hCG-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content in cultured human luteinized granulosa cells. Mol. Cell. Endocrinol. 96, 125-131, 1993. - 53. Gregoraszczyk E. L., Skalka M.: Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. Reprod. Fertil. Dev. 8, 961-967, 1996. - 54. Gröhn Y., Lindberg L. A., Bruss M. L., Farver T. B.: Fatty infiltration of liver in spontaneously ketotic dairy cows. J. Dairy Sci. 66, 2320-2328, 1983. - 55. Gwazdauskas F. C., Kendrick K. W., Pryor A. W., Baird D. T.: Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. J. Dairy Sci. 83, 1625-1634, 2000. - 56. Haraszti J., Huszenicza Gy., Molnár L., Blaskovits: Effect of periparturient lipid mobilization on serum total carotene and vitamin A concentrations in cattle. Acta Vet. Hung. 32, 193-203, 1984. - 57. Haraszti J., Huszenicza Gy., Molnár L., Horkai B.: Veränderungen gewisser metabolischer Blutparameter ante partum und ihre Bedeutung zur Vorhersage der postpartalen Fortpflanzungschancen. Dtsch. tierärztl. Wschr., 89, 357-361, 1982. - 58. Heyden J. M., Williams J. E., Collier J. J.: Plasma growth hormone, insulin-like growth factor, insulin, and thyroid hormone

association with body protein and fat accretion in steers undergoing compensatory gain after dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 71, 3327-3338, 1993. - 59. Higgins R. J., Anderson W. S.: Fat cow syndrome in a British dairy herd. *Vet. Rec.* 113, 461-463, 1983. - 60. Holtenius P.: Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis. *Acta Vet. Scand.* 89, 55-60, 1993. - 61. Holtenius P., Traven M.: Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *J. Vet. Med.* 37, 445-451, 1990. - 62. Houseknecht K. L., Baile C. A., Matteri R. L., Spurlock M. E.: The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405-1420, 1998. - 63. Houseknecht K. L., Portocarrero C. P.: Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Dom. Anim. Endocr.* 15, 457-475, 1998. - 64. Hruska K., Sisak M., Matouskova O., Hruskova M.: Relationship between liver function and progesterone concentration in milk of dairy cattle. IAEA-SM-318/11P. In: Isotope and related techniques in animal production and health. Proc. of a Symposium Jointly Organized by IAEA and FAO, Vienna, 457-459, 1991. - 65. Huszenicza Gy., Fodor M., Gacs M., Kulcsár M., Dohmen M. J. V., Vámos M., Porkoláb L., Kégl T., Bartyik J., Lohuis J. A. C. M., Jánosi Sz., Szita G.: Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 237-245, 1999. - 66. Huszenicza Gy., Haraszti J., Molnár L., Solti L., Fekete S., Ekés K., Yaro A. C.: Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function. *J. Vet. Med.* A 35, 506-515, 1988. - 67. Huszenicza Gy., Kulcsar M., Nikolic J. A., Schmidt J., Korodi P., Katai L., Dieleman S., Ribiczei-Szabo P., Rudas P.: Plasma leptin concentration and its interrelation with some blood metabolites, metabolic hormones and the resumption of cyclic ovarian function in postpartum dairy cows supplemented with Monensin or inert fat in feed. In: Diskin, M.G. (ed.): Fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science, Edinburgh, Occasional publications, 26, 2, 405-409, 2001. - 68. Huszenicza Gy., Molnár L., Solti L., Haraszti J.: Postpartal ovarian function in Holstein and crossbred cows on large scale farms in Hungary. *J. Vet. Med.* A 34, 249-263, 1987. - 69. Ingvarsen K. L., Boisclair Y. R.: Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Dom. Anim. Endocr.* 21, 215-250, 2001. - 70. Jánosi Sz., Huszenicza Gy., Kulcsár M., Kóródi P.: Endocrine and reproductive consequences of certain endotoxin-mediated diseases in farm mammals. A review. *Acta Vet. Hung.* 46, 71-84, 1998. - 71. Jorritsma R., Jorritsma H., Schukken Y. H., Wentink G. H.: Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology* 54, 1065-1074, 2000. - 72. Kadokawa H., Blache D., Yamada Y., Martin G. B.: Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 405-411, 2000. - 73. Kaneene J. B., Miller R. A., Herdt T. H., Gardiner J. C.: The association of serum non-esterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 31, 59-72, 1997. - 74. Keisler D. H., Daniel J. A., Morrison S. D.: The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54, 425-435, 1999. - 75. Kendrick K. W., Bailey T. L., Garst A. S., Pryor A. W., Ahmadzadeh A., Akers R. M., Eyestone W. E., Pearson R. E., Gwazdauskas F. C.: Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.* 82, 1731-1740, 1999. - 76. Kruip T. A., Wensing M. T., Vos P. L. A. M.: Characteristics of abnormal puerperium in dairy cattle and the rationale for common treatments. In: Diskin, M.G. (ed.): Fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science, Edinburgh, Occasional publications, 26, I, 63-79, 2001. - 77. Kunz P. L., Blum J. W., Hart I. C., Bickel H., Landis J.: Effects of different energy intake before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Anim. Prod.* 40, 219-231, 1985. - 78. Lamming G. E., Mann G. E.: A dual role for progesterone in the control of cyclicity in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49, 561-566, 1995. - 79. Lamming G. E., Wathes D. C., Peters A. R.:

- Endocrine patterns of the post-partum cow. J. Reprod. Fert. Suppl. 30, 155-170, 1981. - 80. Larson S. F., Butler W. R., Currie W. B.: Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. J. Dairy Sci. 80, 1288-1295, 1997. - 81. Loeffler S. H., de Vries M. J., Schukken Y. H., de Zeeuw A. C., Dijkhuizen A. A., de Graaf F. M., Brand A.: Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in Holstein dairy cows. Theriogenology 51, 1267-1284, 1999. - 82. Lucy M. C., Crooker B. A.: Physiological and genetic differences between low and high index dairy cows. In: Diskin, M.G. (ed.): Fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science, Edinburgh, Occasional publications, 26, 1 223-236, 2001. - 83. Lucy M. C., Staples C. R., Michel F. M., Thatcher W. W.: Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. J. Dairy Sci. 74, 473-482, 1991. - 84. Mahmoudzadeh A. R., Tarahomi M., Fotoohi H.: Effect of abnormal vaginal discharge at oestrus on conception rate after artificial insemination in cows. Animal Science 72, 535-538, 2001. - 85. Mann G. E., Lamming G. E.: Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. Reproduction 121, 175-180, 2001. - 86. Mann G. E., Mann S. J., Lamming G. E.: The inter-relationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy in the cow. J. Reprod. Fert., Abstract Series 17, 21, 1996. - 87. Maruo T., Hayashi M., Matsuo H., Yamamoto T., Okada H., Mochizuki M.: The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. Endocrinology 121, 1233-1241, 1987. - 88. Massey C. D., Wang C., Donovan G. A., Beede D. K.: Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 852-853, 1993. - 89. Mazur A., Marcos E., Rayssiguier Y.: Plasma lipoproteins in dairy cows with naturally occurring severe fatty liver: Evidence of alteration in the distribution of Apo-A-I-containing lipoproteins. Lipids 24, 805-811, 1989. - 90. McGuire M. A., Vicini J. L., Bauman D. E., Veenhuizen J. J.: Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. J. Anim. Sci. 70, 2901-2910, 1992. - 91. McGuire M. A., Bauman D. E., Dwyer D. A., Cohick W. S.: Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system: response to feed deprivation in lactating cows. J. Nutrition 125, 493-502, 1995. - 92. Minton J. E., Bindel D. J., Drouillard J. S., Titgemeyer E. C., Grieger D. M., Hill C. M.: Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle (Abstract). J. Anim. Sci. 76, Suppl. 1, 899, 1998. - 93. Morisson C. D., Daniel J. A., Holmberg B. J., Djiane J., Raver N., Gertler A., Keisler D. H.: Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. J. Endocrinology, 168, 317-324, 2001. - 94. Morrow D. A.: Fat cow syndrome. J. Dairy Sci. 59, 1625-1629, 1976. - 95. Morrow D., Hillman D., Dade A. W., Kitchen H.: Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174, 161-167, 1979. - 96. Moss G. E., Parfet J. R., Marvin C. A., Allrich R. D., Diekman M. A.: Pituitary concentrations of gonadotropins and receptors for GnRH in suckled beef cows at various intervals after calving. J. Anim. Sci. 60, 285-291, 1985. - 97. Nagatani S., Guthikonda P., Thompson R. C., Tsukamura I. I., Maeda K. I., Foster D. L.: Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. Neuroendocrinology 67, 370-376, 1998. - 98. Nagatani S., Zeng Y., Keisler D. H., Foster D. L., Jaffe C. A.: Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. Endocrinology 141, 3965-3975, 2000. - 99. Nikolic J. A., Samanc H., Begovic J., Damjanovic Z., Dokovic R., Kostic G., Lrsmanovic J., Resanovic V.: Low peripheral serum thyroid hormone status independently affects the hormone profile of healthy and ketotic cows during the first week postpartum. Acta Vet. (Beograd) 47, 3-14, 1997. - 100. Parr R. A., Davis I. F., Miles M. A., Squires T. J.: Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. Res. Vet. Sci. 55, 306-310, 1993.

- 101. Perera K. S., Gwazdauskas F. C., Akers R. M., Pearson R. E.: Seasonal and lactational effects on response to thyrotropin releasing hormone injection in Holstein cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2, 43-52, 1985. - 102. Perry R.C., Corah L.R., Cochran R.C., Beal W. E., Stevenson J. S., Minton J. E., Simms D. D., Brethour J. R.: Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 69, 3762-3773, 1991. - 103. Pethes G., Bokori J., Rudas P., Frenyo V. L., Fekete S.: Thyroxine, triiodothyronine, reverse-triiodothyronine, and other physiological characteristics of periparturient cows fed restricted energy. *J. Dairy Sci.* 68, 1148-1154, 1985. - 104. Rajamahendran R., Taylor C.: Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 171-180, 1990. - 105. Rayssiguier Y., Mazur A., Gueux E., Reid I. M., Roberts C. J.: Plasma lipoproteins and fatty liver in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 45, 389-393, 1988. - 106. Reid I. M., Rowlands G. J., Dew S. M., Collins R. A., Roberts C. J., Manston R.: The relationship between post-parturient fatty liver and blood composition in dairy cows. *J. Agri. Sci.* 101, 473-480, 1983. - 107. Rhodes F. M., Clark B. A., Nation D. P., Taufa V. K., MacMillan K. L., Day M. L., Day A. M., McDougall S.: Factors influencing the prevalence of postpartum anoestrus in New Zealand dairy cows. *Proc. of New Zealand Society of Animal Production* 58, 79-81, 1998. - 108. Roberts A. J., Nugent R. A., Klindt J., Jenkins T. G.: Circulating insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 75, 1909-1917, 1997. - 109. Ronge H., Blum J. W.: Insulin-like growth factor-I responses to growth hormone in dry and lactating dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 62, 280-288, 1989. - 110. Ronge H., Blum J., Clement C., Jans F., Leuenberger H., Binder H.: Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production. *Anim. Prod.* 47, 165-183, 1988. - 111. Royal M. D., Darwash A. O., Flint A. P. F., Webb R., Woolliams J. A., Lamming G. E.: Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim. Sci.* 70, 487-501, 2000. - 112. Rukkwamsuk T., Kruip T. A. M., Wensing T.: Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postpartum period. *Vet. Quart.* 21, 71-77, 1999a. - 113. Rukkwamsuk T., Wensing T., Kruip T. A. M.: Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 51, 1133-1142, 1999b. - 114. Rutter L. M., Randel R. D.: Postpartum nutrient intake and body condition: effect on pituitary function and onset oestrus in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 58, 265-274, 1984. - 115. Samanc H., Nikolic J. A., Stojic V., Dokovic R., Damjanovic Z., Ivanov I.: Glucose tolerance and propionate loading tests in the assessment of endocrine pancreatic function in healthy and ketotic cows. *Acta Vet. (Beograd)* 46, 245-254, 1996. - 116. Savio J. D., Boland M. P., Hynes N., Roche J. F.: Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 70, 1271-1282, 1990. - 117. Schillo K. K.: Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70, 1271-1282, 1992. - 118. Schneider J. E., Zhou D., Blum R. M.: Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm. Behav.* 37, 306-326, 2000. - 119. Senger P. L.: Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions Inc., Pullman, Washington, 1999. - 120. Shaham-Albalancy A., Nyska A., Kaim M., Rosenberg M., Folman Y., Wolfenson D.: Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 159-174, 1997. - 121. Shelton K., Gayerie de Abreu M. F., Hunter M. G., Parkinson T. J., Lamming G. E.: Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J. Reprod. Fert.* 90, 1-10, 1990. - 122. Smith G. D., Jackson L. M., Foster D. L.: Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology* 57, 73-86, 2002. - 123. Smith M. C. A., Wallace J. M.: Influence of early postpartum ovarian activity on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. *J. Reprod. Fert.* 110, 207-216, 1998. - 124. Snijders S. E. M., Dillon P. G., O'Callaghan D., Boland M. P.: Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte develop-

ment in dairy cows. *Theriogenology* 53, 981-989, 2000. - 125. Snijders S. E. M., Dillon P. G., O'Farrell K. J., Diskin M., Wylie A. R. G., O'Callaghan D., Rath M., Boland M. P.: Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 17-31, 2001. - 126. Spicer L. J.: Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Dom. Anim. Endocr.* 21, 251-270, 2001. - 127. Spicer L. J., Alpizar E., Echternkamp S. E.: Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71, 1232-1241, 1993. - 128. Spicer L. J., Enright W. J., Murphy M. G., Roche J. F.: Effects of dietary intake on concentrations of insulin-like growth factor-1 in plasma and follicular fluid, and ovarian function in heifers. *Dom. Anim. Endocr.* 8, 431-437, 1991. - 129. Spicer L. J., Stewart R. E.: Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol. Reprod.* 54, 255-263, 1996. - 130. Spicer L. J., Tucker W. B., Adams G. D.: Insulin-like growth factors in dairy cows: relationship among energy balance, body condition, ovarian activity and estrous behavior. *J. Dairy Sci.* 73, 929-937, 1990. - 131. Spicer L. J., Alonso J., Chamberlain C. S.: Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J. Dairy Sci.* 84, 1069-1076, 2001. - 132. Stabenfeldt G. H., Edqvist L.-E.: Female reproductive processes. In: Swenson, M. J. (ed) *Dukes' physiology of domestic animals*. Tenth edition. Cornell University Press, Ithaca, pp. 798-832, 1990. - 133. Staples C. R., Thatcher W. W., Clark J. H.: Relationship between ovarian activity and energy balance during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73, 938-947, 1990. - 134. Steen A., Gronstol H., Torjesen P. A.: Glucose and insulin responses to glucagon injection in dairy cows with ketosis and fatty liver. *J. Vet. Med.* 44, 521-530, 1997. - 135. Stevenson J. S., Kobayashi Y., Thompson F. N.: Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F₂. *J. Dairy Sci.* 82, 506-515, 1999. - 136. Steward R. E., Spicer L. J., Hamilton T. D., Keefer B. E.: Effects of insulin-like growth factor 1 and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone induced steroidogenesis of bovine theca cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor 1 and luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 73, 3719-3731, 1995. - 137. Strang B. D., Bertics S. J., Grummer R. R., Armentano L. E.: Relationship of triglyceride accumulation to insulin clearance and hormonal responsiveness in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 81, 740-747, 1988. - 138. Tiirats T.: Thyroxine, triiodothyronine and reverse- triiodothyronine concentrations in blood plasma in relation to lactation stage, milk yield, energy and dietary protein intake in Estonian dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 38, 339-348, 1997. - 139. Top A. M., van den Geelen M. J. H., Wensing T., Wentink G. H., Klooster A. T., van Beynen A. C.: Higher postpartum hepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with lower activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase. *J. Nutr.* 126, 76-85, 1996. - 140. Tveit B., Lingaas F., Standal N.: Thyroid function in heifers measured by hormone levels before and after injection of thyrotropin releasing hormone. Methods, repeatability and correlation with production traits. *Acta Agric. Scand.* 40, 175-181, 1990a. - 141. Tveit B., Lingaas F., Standal N.: Thyroid function in heifers measured by hormone levels before and after injection of thyrotropin releasing hormone. Effect of parturition. *Acta Agric. Scand.* 40, 183-188, 1990b. - 142. Villa-Godoy A., Hughes T. L., Emery R. S., Chapin L. T., Fogwell R. L.: Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71, 1063-1072, 1988. - 143. Wakim A. N., Paljug W. R., Jasnosz K. M., Alhakim N., Brown A. B., Burholt D. R.: Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. *Fertil. Steril.* 62, 531-534, 1994. - 144. West H. J.: Effect on liver function of acetoneemia and the fat cow syndrome in cattle. *Res. Vet. Sci.* 48, 221-227, 1990. - 145. Whisnant C. S., Kiser T. E., Thompson F. N., Hall J.

B.: Effect of nutrition on the LH response to calf removal and GnRH. *Theriogenology* 24, 565-573, 1985. - 146. Wiltbank M. C., Sartori R., Sangsritavong S., Lopez H., Haughian J. M., Fricke P. M., Gumen A.: Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84 (Suppl. 1), 32, 2001. - 147. Yoshida T., Monkawa T., Hayashi M., Saruta T.: Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 232, 822-826, 1997. - 148. Yung M. C., Van de Haar M. J., Fogwell R. L., Sharma B. K.: Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor 1 in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J. Anim. Sci.* 74, 2239-2244, 1996. - 149. Zanker C. L., Swaine I. L.: The relationship between serum oestradiol concentration and energy balance in young women distance runners. *Int. J. Sports Med.* 19, 104-108, 1998. - 150. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-435, 1994.

APOPTOZA KAO NAČIN PRIRODNOG ODUMIRANJA ČELIJA JAJNIKA*

APOPTOSIS AS FORM OF NATURAL OVARIAN CELL DEATH

Anita Radovanović, Jelka Stevanović, Dušan Gledić**

Među signale za pokretanje apoptoze u ćelijama jajnika ubrajaju se razni hormoni, citokini, odsustvo faktora rasta i drugi. Svaki od njih, na svoj način, pokreće apoptozu kao oblik smrti u kome ćelija aktivno učestvuje tako što precizno sprovodi genetski programiran sled biohemijskih i morfoloških promena koje je vode u autodestrukciju. Apoptoza je fiziološki oblik smrti, pomoću kojeg se obezbeđuje uspostavljanje dinamičke ravnoteže između proliferacije, diferencijacije i odumiranja ćelija jajnika.

Do sada je potvrđeno da u jajnicima apoptozom odumiru folikularne ćelije, ovociti, ćelije klicinog epitela, ćelije teke i žutog tela. Fiziološka smrt ovih ćelija je sastavni deo normalne funkcije jajnika, kako tokom intrauterinog, tako i za vreme postnatalnog života. Naime, tokom intrauterinog razvoja jajnika apoptozom odumre oko polovina od ukupnog broja germinativnih ćelija (budućih ovocita), a posle rođenja njihova populacija postepeno se smanjuje „odabirom folikula” koji će nastaviti dalji razvoj (folikulogeneza) i apoptotskim odumiranjem ćelija onih folikula koji će podleći atreziji. Većina ćelija jajnika odumire apoptozom kontinuirano do kraja reproduktivnog perioda života zdravih ženki, a neke mogu da odumiru, na ovaj način, sve do smrti jedinke (na primer ćelije klicinog epitela).

Ključne reči: ćelije jajnika, apoptoza

Uvod / Introduction

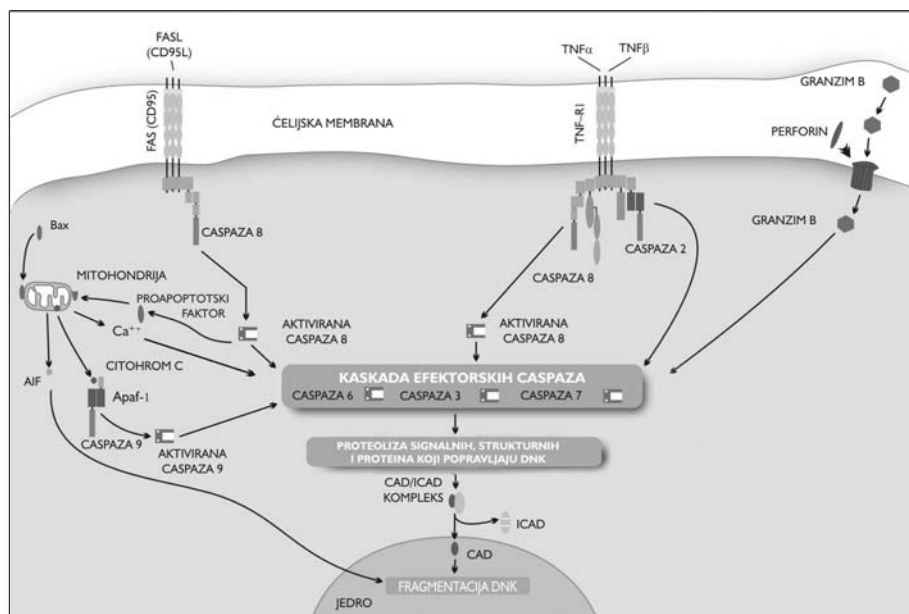
Apoptoza, kao vid ćelijske smrti, osnovni je genetski programirani mehanizam za kontrolu broja ćelija, kojim se uspostavlja dinamička ravnoteža iz-

* Rad primljen za štampu 2. 2. 2004. godine

** Dr Anita Radovanović, asistent, Katedra za histologiju i embriologiju, dr Jelka Stevanović, vanredni profesor, Katedra za fiziologiju i biohemiju, dr Dušan Gledić, redovni profesor, Katedra za histologiju i embriologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

među proliferacije, diferencijacije i odumiranja ćelija. Apoptoza asinhrono zahvata pojedinačne ćelije ili male grupe u okviru istog tkiva. U ovom obliku smrti, ćelija aktivno učestvuje tako što precizno sprovodi genetski programiran sled bio-hemijskih i morfoloških promena koje je vode u autodestrukciju. O značaju apoptoze za homeostazu broja ćelija najrečitije govori to što poremećaji ovog prirodnog načina odumiranja ćelija vode u razvoj autoimunskih, malignih i neurodegenerativnih procesa, reproduktivnih i drugih poremećaja [1, 2, 3].

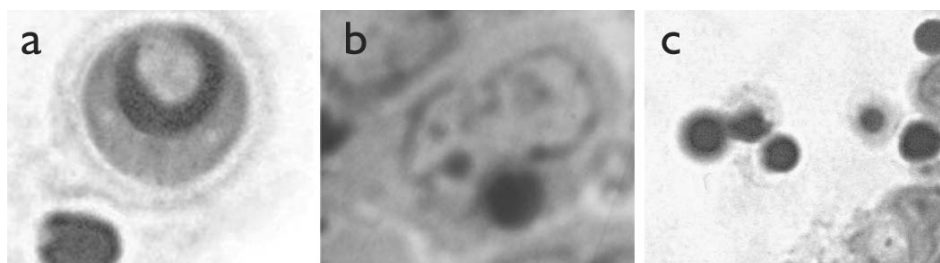
U cilju održavanja homeostaze broja ćelija na njih neprekidno deluju mnogobrojni proapoptotski i antiapoptotski faktori. Sposobnost ćelije da, u zavisnosti od svog metaboličkog statusa, starosti i faze razvoja, kao i od prirode i vremena pojavljivanja ovih signala, podlegne njihovom dejstvu ili ga uspešno izbegne, uvodi je u smrt apoptozom ili joj omogućava da nastavi započeti ciklus. *Signal za pokretanje apoptoze* je delovanje proapoptotskih faktora i/ili odsustvo faktora rasta. U opšte *proapoptotske faktore* ubrajaju se razni hormoni, citokini, virusni proteini, bakterije i njihovi toksini, neki joni, dejstvo umerene radijacije i drugi [4, 5]. Neki od njih su genotoksični, drugi deluju preko receptora na ćelijskoj membrani (apoptoza indukovana ligandima kao što su: *Fas ligandi*, hormoni i citokini), treći su proteolitički enzimi (granzimi i perforini) koji direktno ulaze u ćeliju kako bi indukovali njenu apoptozu (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz nekih od mehanizama aktivacije apoptoze i značaja mitohondrija za ovaj proces

Figure 1. Schematic presentation of some mechanisms that activate apoptosis and significance of mitochondria in this process

Premda su razlozi za ulazak ćelija u apoptozu različiti, posle pokretanja ovaj proces se odvija svojim tokom. Naime, apoptoza započinje latencijom, koja traje različito (od nekoliko minuta ili sati, do nekoliko dana), u zavisnosti od vrste signala i tipa ciljane ćelije, a ne može da se prepozna histološki [6, 7, 8]. Međutim, kako proces odmiče, biohemijske promene postepeno uzrokuju morfološki prepoznatljive znake apoptoze u vidu: kondenzacije hromatina (slika 2a), smanjenja volumena ćelije, fragmentacije DNK (slika 2b) i pupljenja ćelijske membrane kako bi se formirala apoptotska telašca (slika 2c). Ona sadrže delove citosola, jedra, jedarceta i očuvane ostale organele, zaodenate kompaktnom ćelijskom membranom [6, 7, 8, 9]. Apoptotska ćelija se konačno raspada na ova telašca, koja razni fagociti i okolne ćelije uklanjaju i razgrađuju, a njihove razgradne produkte koriste za svoje potrebe tako da ne dolazi do razvoja patološkog procesa [7].

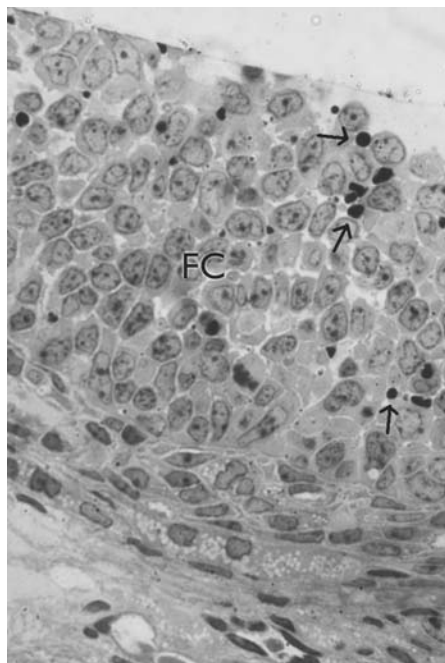


Slika 2. Apoptoza folikularnih ćelija jajnika pacova: a. kondenzacija hromatina u obliku potkovice; b. fragmentacija jedra; c. odvajanje apoptotskih telašaca (metilensko plavo)
Figure 2. Apoptosis of follicular cells of rat ovaries: a. Horseshoe-shaped chromatin condensation; b. nucleus fragmentation; c. separation of apoptotic bodies (methylene blue)

Odumiranje ćelija jajnika apoptozom / Ovarian cell death by apoptosis

Neprekidno remodeliranje tkiva, u vidu proliferacije jednih uz apoptotične promene drugih ćelija, zajedno obezbeđuju normalan razvoj i funkcionisanje celog ženskog reproduktivnog sistema, a naročito jajnika. Još u vreme prenatalnog razvoja kod ženki dolazi do uklanjanja Wollfovih kanala upravo apoptozom, a posle završene migracije primordijalnih germinativnih ćelija iz žumancetne kese i njihovih intenzivnih mitotičkih deoba, najveći deo germinativnih ćelija uklanja se, takođe, apoptozom [10]. Tako se, tokom prenatalnog razvoja eliminiše polovina populacije budućih ovocita [11], a preostali deo, koji je inkorporiran u folikule i ušao je u prvu fazu mejotičke deobe do dihtiotena, predstavlja maksimalan broj kojim se raspolaže tokom čitavog postnatalnog perioda. Od njih se posle rođenja, pa sve do kraja reproduktivnog perioda, razvijaju folikuli, od kojih većina

podleže atreziji u različitim fazama razvoja (70 do 99,9 posto – u zavisnosti od životinjske vrste), dok samo odabrani folikuli ovuliraju [12]. Pitanje „odabira folikula” u jajniku još uvek nije u potpunosti razjašnjeno, ali je poznato da se odvija kroz inicijalni odabir koji podrazumeva prevođenje primordijalnih u primarne folikule, i ciklični odabir koji se odvija tokom svakog polnog ciklusa [12, 13, 14]. Cikličnim odabirom se biraju folikuli koji prelaze u antralne, od kojih samo ograničeni broj ovulira, dok ostali podležu atreziji tako što njihove folikularne ćelije odumiru apoptozom (slike 2 i 3). Fagocitozu ostataka ovocita i apoptotskih granulosa ćelija atretičnog folikula uglavnom obavljaju susedne granulosa ćelije (slika 2), mada, u tome mogu da učestvuju i ćelije teke, s obzirom da poseduju za to neophodne receptore [15, 16]. Pri tom veći deo ćelija teke atretičnog folikula hipertrofira u sekundarne intersticijalne ćelije, koje zaposedaju mesto atretičnog folikula, a ostatak i sam podleže apoptozi [17].



Slika 3. Apoptoza folikularnih ćelija atretičnog folikula jajnika pacova (metilensko plavo) FC – folikularne ćelije → apoptotsko telašće
Figure 3. Apoptosis of follicular cells of atretic follicle of rat ovaries (methylene blue) FC – follicular cells → apoptotic bodies

Promene ovocita u toku atrezije folikula različito se tumače. Jedan broj autora smatra da i ovociti odumiru apoptozom [10, 18, 19], mada ima i suprotnih mišljenja, po kojima je taj proces specifičan i ne odgovara klasičnom opisu apoptoze [13, 20, 21]. Osim ćelija folikula i ćelija teke atretičnih folikula jajnika, potvrđeno je da apoptozom odumiru ćelije klicinog epitela iznad preovulatornog folikula [22] i ćelije žutog tela [23].

O signalima za pokretanje apoptoze u jajniku pod fiziološkim uslovima teško je uprošteno govoriti, jer se delovanje različitih endokrinih, parakrinih i autokrinih faktora neprestalno prepliće.

Značaj hormona i faktora rasta / Significance of growth hormones and factors

Endokrini uticaj ostvaruje se posredovanjem većeg broja hormona, među kojima su: gonadotropini (naročito FSH), estrogeni, androgeni, tireoidni

hormoni i hormon rasta. Sudbina većine folikula je atrezija, a samo odabrani preživljavaju i ovuliraju, pod prevashodnim uticajem gonadotropnih hormona, a posebno FSH. Naime, pad nivoa gonadotropina u cirkulaciji, bilo kao posledica hipofizektomije ili blokade LH/FSH talasa, dovodi do značajne atrezije folikula [24, 25]. Pri tom se apoptoza izazvana hipofizektomijom može da ublaži tretmanom sa FSH [24, 25]. Osim gonadotropina, apoptozu folikularnih ćelija inhibiraju i estrogeni, dok se androgeni ponašaju kao antagonisti estrogena kada je u pitanju apoptoza folikularnih ćelija [26, 27]. Uloga tireoidnih hormona u regulaciji ravnoteže između proliferacije i apoptoze na molekularnom nivou slabo je proučena, na samo u reproduktivnim, nego i u drugim organima. Premda mehanizam indukovanja apoptoze ćelija jajnika tireoidnim hormonima nije objašnjen, histološke i citološke analize folikula pacova pokazale su da hipertireoidizam, izazvan u neonatalnom periodu dozom od 150 µg tiroksina, dovodi do povećanja broja atretičnih folikula [28, 29, 30, 31]. Povećanje broja atretičnih folikula u različitim fazama folikulogeneze (u jajnicima pacova uzrasta od 15, 30 i 60 dana) dokazano je kod ženki pacova čije su majke u graviditetu i tokom laktacije bile hipotireoidne [21, 28, 32, 33, 34, 35]. Histološka i citološka analiza njihovih atretičnih folikula potvrdila je da, kao i kod zdravih pacova, folikularne ćelije hipo- i hipertireoidnih pacova odumiru apoptozom [21, 32, 33, 34, 35, 36].

Noviji radovi pokazuju da uticaj hormona na aktivaciju ili inhibiciju apoptoze nije direktan, već se uglavnom ostvaruje posredstvom različitih faktora rasta [37]. Tako su *in vitro* proučavanja intraovarijalnog signalnog sistema pokazala da je nekoliko faktora rasta deo ovog mehanizma. Jedan od njih je i *IGF-I* koji, pored toga što učestvuje u ćelijskoj proliferaciji [38], reguliše i apoptozu u jajnicima tako što inhibira njen razvoj u ranim antralnim i preovulatornim folikulima [39, 40]. Stimulacijom ekspresije IGF-I, uz smanjenje ekspresije nosača ovog faktora rasta (IGFBPs*), gonadotropini mogu da inhibiraju apoptozu granulosa ćelija [41, 42]. Indukcija apoptoze preantralnih i antralnih folikula može da se postigne, ne samo padom nivoa IGF-I, već i pojačanom sintezom proteinskih nosača koji vezuju ovaj hormon. Tako su Erickson i sar. [43] potvrdili da pojačana sinteza IGFBP-4, pod uticajem GnRH, može da indukuje apoptozu folikularnih ćelija pacova. Hormon rasta utiče na supresiju apoptoze u preovulatornim folikulima, stimulacijom sinteze IGF-I, ali ne i u ranim antralnim folikulima, jer njihove ćelije poseduju IGFBPs, koji vezuju ovaj hormon tako da ga ima malo slobodnog, pa je apoptoza u ovoj fazi razvoja folikula indukovana [44].

Faktori rasta kao što su EGF**/TGF*** i βFGF**** sprečavaju apoptozu u jajniku delujući preko tirozin-kinaze. Smatra se da nedostatak ovih faktora rasta, kao i c-kit/KL⁺ vodi u eliminaciju ovocita primordijalnih folikula [45]. U kulturi teka i

* IGFBPs – proteini nosači IGF-a.

** EGF – faktor rasta ćelija epiderma.

*** TGF – transformišući faktor rasta.

**** βFGF – faktor rasta fibroblasta.

+ KL – Kit ligand.

intersticijalnih ćelija tretiranih sa $TGF\alpha$ i $TGF\beta$ dolazi do apoptoze supresijom gena za Bcl_2 i stimulacijom gena za caspazu-1 [17]. Sa rastom folikula povećava se ekspresija subjedinična aktivina, faktora rasta iz familije $TGF\beta$ koji inhibira apoptozu granulosa ćelija, a maksimalni supresorski efekat aktivin postiže u fazi ranog antralnog folikula [40]. LH inhibira apoptozu granulosa ćelija preovulatornih folikula tako što stimuliše sintezu interleukina 1β [12].

Značaj Fas receptora i Fas liganda / *Significance of Fas receptors and Fas ligand*

Već je istaknuto da se apoptoza može da pokrene i vezivanjem Fas liganda (FasL) za Fas receptor, tj. CD95 (slika 1). Tako se aktivira caspaza-8 koja omogućava oslobađanje citohroma-c iz mitohondrija [1, 8, 46], a podstiče i kaskadu tokom koje se aktiviraju druge caspaze koje indukuju morfološke promene ćelije karakteristične za apoptozu (slika 1). Postojanje sistema *Fas receptor/Fas ligand* izvan imunskog sistema prvi put je ustanovljeno upravo u okviru folikula, tako što je potvrđeno da ovociti ekspimiraju Fas ligand dok folikularne ćelije atretičnih folikula ekspimiraju Fas receptore [47]. Osim u atreziji folikula, ovaj sistem učestvuje i u luteolizi tako što sitnije nesteroidogene ćelije žutog tela odgovaraju na delovanje prolaktina ekspimiranjem Fas liganda, dok pod uticajem ovog hormona krupnije steroidogene ćelije ispoljavaju Fas receptore [23].

Značaj mitohondrija, Bax-proteina i Bcl_2 proteina / *Significance of mitochondria, Bax-proteins and Bcl_2 proteins*

U novije vreme se mitohondrije smatraju centralnim mestom odluke ulaska ili neulaska u apoptozu svih ćelija, pa i ovocita [13, 48]. Mnogobrojni radovi potenciraju značaj **mitohondrija** u procesu apoptoze [8, 42, 49], upravo zato što se posle vezivanja odgovarajućeg proapoptotskog faktora (na primer, Bax-proteina) menja vrednost transmembranskog potencijala njihove spoljašnje membrane (slika 1), koja zato menja permeabilitet tako da omogućava pojačano oslobađanje kalcijumovih jona, citohroma-c i faktora indukcije apoptoze - AIF* [42, 49]. Kalcijumovi joni oslobođeni iz matriksa mitohondrija prelaze u citosol i aktiviraju enzime uključene u apoptozu (slika 1). Molekuli citohroma-c posle izlaska iz mitohondrija vezuju se za Apaf-1** u kompleks koji aktivira caspazu-9 kako bi preko nje pokrenula čitavu kaskadu caspaza (slika 1), dok AIF deluju direktno na jedro, izazivajući fragmentaciju DNK [7, 8, 9]. Međutim, sve mitohondrije ćelije koja je ušla u apoptozu ne reaguju na isti način. Naime, ustanovljeno je da u kulturi granulosa ćelija u kojoj je indukovana apoptoza izvestan broj mitohondrija sadrži, u proširenom prostoru između kristi, količinu citohroma-c karakterističnu za povećanu proizvodnju ATP-a. Ovaj nalaz nesumljivo potvrđuje značaj

* AIF – faktor indukcije apoptoze.

** Apaf-1 – faktor aktivacije proteaza apoptoze.

respiratornog lanca granuloza ćelija, kao izvora energije za odvijanje apoptoze sve do njenih kasnih faza [50].

Navedeni podaci nesumljivo ukazuju na veliki značaj mitohondrija za pokretanje apoptoze svih ćelija, pa i ćelija jajnika [51, 52, 53]. Budući da prilikom oplodjenja plod nasleđuje sve svoje mitohondrije iz ovocita majke [13, 48], tokom ovogeneze i folikulogeneze odvija se selekcija ovocita kojom se mladuncima obezbeđuju mitohondrije dobrog kvaliteta, tim pre što je dokazano da je njihova DNK znatno podložnija mutacijama od jedarne. Opisani sistem kontrole apoptoze je naročito značajan za životinjske vrste koje rađaju mali broj mladunaca.

Značaj mitohondrija za apoptozu potkrepljuju i podaci po kojima je hipotireoidizam, za koga je potvrđeno da podstiče apoptotske procese [21, 34, 54, 55], praćen promenjenom propustljivošću membrana mitohondrija [56], njihovim uvećanjem i vakuolizacijom, kao i smanjenjem broja kristi, što sve zajedno uzrokuje ulazak ćelije u apoptozu. Naime, u mitohondrijama nervnih ćelija hipotireoidnih životinja ustanovljeno je veće prisustvo proapoptotskih **Bax-proteina** u odnosu na eutireoidne životinje, kod kojih je njihovo prisustvo ograničeno [54, 55]. U prilog ovome su i podaci da se tokom razvoja malog mozga hipotireoidnih pacova zapažaju promene koje uvode ćelije u latentnu fazu apoptoze, poput translokacije citohroma c, AIF-a i sekundarnog aktivatora caspaza poreklom iz mitohondrija - SMAC [55]. *Bax-proteini* se smatraju odgovornim za pokretanje apoptoze i u ovocitima, s obzirom da je potvrđeno da transgeni miševi kojima nedostaju geni za Bax-proteine imaju produžen reproduktivni period [19, 57]. Nasuprot Bax-proteinima koji indukuju apoptozu, **Bcl-2 proteini**, koji su vezani za spoljašnju membranu mitohondrija, inhibiraju njen razvoj [49]. Najranija ekspresija Bcl-2 gena u okviru jajnika je zapažena u germinativnim ćelijama primordijuma gonada [52]. Istraživanjima *in vitro* je ustanovljeno da gonadotropni hormoni preveniraju apoptozu i atreziju folikula pretežno značajno redukujući nivo iRNK za Bax-proteine, bez promena u ekspresiji iRNK za Bcl-2 protein [51].

Značaj proteina p53 / *Significance of p53 protein*

Posle prelaska iz citosola u jedro *protein p53* se direktno vezuje za DNK, prepoznaje njena oštećenja i ukoliko se radi o oštećenjima kod kojih je moguća reparacija zaustavlja ćeliju u kasnoj G1 fazi ćelijskog ciklusa [3]. Međutim, ako se radi o nereparabilnim oštećenjima DNK, protein p53 upućuje ćeliju u apoptozu intenzivirajući sintezu Bax-proteina, kojom se menja odnos Bax/Bcl-2 [8]. U okviru jajnika protein p53 je za sada imunocitohemijski dokazan samo u jedrima apoptotskih granuloza ćelija atretičnih folikula pacova [58]. Ispitivanjima *in vitro* je ustanovljeno da gonadotropni hormoni inhibiraju apoptozu granuloza ćelija upravo značajnim smanjivanjem nivoa iRNK za protein p53 [51].

Caspaze / *Caspases*

Caspaze (*cistein-proteaze*) predstavljaju čitavu grupu enzima koji katalizuju ključne događaje tokom razvoja apoptoze (slika 1). Sintetišu se u formi proenzima (pro-caspaza,) a aktiviraju se proteolizom [1, 7]. U fazi fragmentacije jedra, koja traje nekoliko minuta, caspaze aktiviraju caspaza-zavisne endonukleaze (CAD*; slika 1) koje izazivaju, za apoptozu specifičan, internukleozomski prekid molekula DNK. Dokazano je da se DNK granulosa ćelija atretničnih folikula cepa na fragmente od 185 do 200 parova kilobaza [6, 58, 59]. U kulturi granulosa luteinskih ćelija inhibitor protein kinaza, staurosporin, podstiče cepanje caspaze-9 i tako utiče na aktivaciju i porast aktivnosti caspaze-3. Supstrat za caspazu-3 je poli-ADP-riboza-polimeraza koja fragmentira molekul DNK između nukleozoma [53]. Sličan efekat izaziva i antagonist progesteronskih receptora (RU486S), dok deksametazon i dihidrotestosteron, dodati u kulturu granulosa luteinskih ćelija, ne pokreću ovakav efekat [46]. Caspaza-3 je ključni egzekutor apoptoze jer, osim što izaziva fragmentaciju DNK, fragmentira i različite strukturne, signalne i druge intracelularne proteine (slika 1). S obzirom da je ovaj enzim imunocitohemijski dokazan u luteinskim ćelijama razvijenog žutog tela, u teki folikula i u granulosa ćelijama atretničnih folikula, ali ne i u zdravim folikulima, može da se zaključi da ekspresiju gena za caspazu-3 regulišu gonadotropni hormoni [60].

Zaključak / *Conclusion*

U ovom radu pokušali smo da damo pregled iz obilja informacija o raznim aspektima apoptoze ćelija jajnika. U tom cilju smo naveli podatke o, za sada poznatim, signalima, biohemijskim i morfološkim promenama koje karakterišu apoptotsko odumiranje folikularnih ćelija, ovocita, ćelija klicinog epitela, ćelija teke i žutog tela, kao i podatke o pokušajima uspostavljanja kontrole toka apoptoze.

Jajnik je vrlo dobar model za izučavanje promena koje karakterišu apoptotsko odumiranje ćelija, budući da se njegovo tkivo neprekidno remodelira, zahvaljujući između ostalog i apoptotskom odumiranju njegovih ćelija, kako tokom intrauterinog tako i za vreme postnatalnog razvoja. Osim toga tkivo jajnika je, iz istih razloga, veoma podesno i za izučavanje poremećaja apoptoze, odnosno prekomerne proliferacije koja može da dovede do razvoja preneoplastičnih i neoplastičnih promena ili do prekomernog uklanjanja ćelija koje se manifestuju atrofijom tkiva jajnika.

* CAD – DNK-aze koje se aktiviraju pomoću caspaza.

Literatura / References

1. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 11, 391-403, 1998.
- 2. Roulston A., Marcellus R. C., Branton P. E.: Viruses and apoptosis, *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 577-628, 1999.
- 3. Ruley H. E.: p53 and responses to chemotherapy and radiotherapy, In: *Important Advances in Oncology*, ed. De Vita VT, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 37-56, 1996.
- 4. Wahl G. M., Carr A. M.: The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell. Biol.* 3, 277-286, 2001.
- 5. Bratton S. B., Cohen G. M.: Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 306-315, 2001.
- 6. Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Currie A. R.: Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, 1980.
- 7. Cohen G. M.: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 3261-3216, 1997.
- 8. Israels L. G., Israels E. D.: Apoptosis, *The Oncologist*, 4, 4, 332-339, 1999.
- 9. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.: Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257, 1972.
- 10. Morita Y., Tilly J. L.: Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.* 213, 1-17, 1999.
- 11. Sadler T. W.: Gametogenesis. In: *Langman's medical embryology sixth edition*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 3-20, 1990.
- 12. Hsueh A. J. W., Billig H., Tsafirri A.: Ovarian follicle atresia: Hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15, 707-725, 1994.
- 13. Vaskivuo T.: Regulation of apoptosis in the female reproductive system, *Academic Dissertation*, University of Oulu, Finland, 2002.
- 14. Peter A. T., Dhanasekaran N.: Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 209-213, 2003.
- 15. Palumbo A., Yeh J.: *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol. Reprod.*, 51, 888-895, 1994.
- 16. Svensson P. A., Johnson M. S. C., Ling C., Carlsson L. M. S., Billig H., Carlsson B.: Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells. *Endocrinol.*, 140, 2494-2500, 1999.
- 17. Foghi A., Teerds K. J., van der Donk H., Moore N. C., Dorrington J.: Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) α plus TGF β on bcl-2 and interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Endocrinol.* 157, 489-494, 1998.
- 18. Pesce M., De Felici M.: Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat. Embryol. (Berl)* 189, 435-440, 1994.
- 19. Ratts V. S., Flaws J. A., Kolp R., Sorenson C. M., Tilly J. L.: Ablation of bcl-2 gene expression decreased the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinol.*, 136, 3665-3668, 1995.
- 20. Devine P. J., Payne C. M., McCuskey M. K., Hoyer P. B.: Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol. of Reprod.*, 63, 1245-1252, 2000.
- 21. Radovanović A.: Uticaj smanjene funkcije štitaste žlezde na jajnike pacova tokom polnog sazrevanja, *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Beogradu, 2003.
- 22. Ackerman R.C., Murdoch W. J.: Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins* 45, 475-485, 1993.
- 23. Kuranaga E., Kanuka H., Furuhashi Y., Yonezawa T., Suzuki M., Nishihara M., Takahashi M.: Requirement of the Fas ligand-expressing luteal immune cells for regression of corpus luteum, *FEBS Letters*. 472, 137-142, 2000.
- 24. Ingram D. L.: The effect of hypophysectomy on the number of oocytes in the adult albino rat, *J. Endocrinol.* 9, 307-311, 1953.
- 25. Braw R. H., Tsafirri A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 59, 267-272, 1980.
- 26. Billig H., Furuta I., Hsueh A. J. W.: Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinol.*, 133, 2204-2212, 1993.
- 27. Billig H., Furuta I., Hsueh A. J. W.: Gonadotrophin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells, *Endocrinol.* 134, 245-251, 1994.
- 28. Radovanović A.: Efekat hipotireoidizma majki i perinatalnog hipertireoidizma na

- jajnike juvenilnih pacova, Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, 1993. - 29. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Jajnici juvenilnih pacova tretiranih DL-tiroksinom. *Folia Anatomica* .21/22, Suppl. 1, Zbornik radova XXIII kongresa Društva anatoma Jugoslavije, 38, 1994. - 30. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Dose-dependent effects of thyroxin on the ovaries of juvenile rats. XII-th Int. Symp. on Morphol. Sci., Abstracts, Thessaloniki, 111-112, 1995. - 31. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Follicular development and atresia in the ovaries of thyroxine treated juvenile rats, *Acta Veterinaria*, 47, 87-94, 1997. - 32. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: The effect of hypothyroidism in pregnant and lactating dams on the ovaries of juvenile pups, *Acta Anatomica*, Timisoara, 1, 99-100, 1994. - 33. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Follicular atresia in ovaries of hypothyroid juvenile rats, *Folia Anatomica* .4, 134, 1996. - 34. Radovanović A., Marković D., Gledić D.: Effects of prenatal and postnatal goitrogen treatment on folliculogenesis and follicular atresia in rats. XVII Int. Symp. on Morphol. Sci., Timisoara, Romania, The Abstracts book, 264-265, 2002. - 35. Šimić M., Gledić D., Radovanović A.: Some neuroendocrine aspects of hypothyroidism in juvenile rats. *Basic and Clinical Aspects of the Theory of Functional Systems*. Eds.: Lažetić and Sudakov, Medical Faculty University of Novi Sad and P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology RAM Moscow, Novi Sad, 233-241, 1998. - 36. Stevanović J., Radovanović A., Merčep D.: Apoptoza kao način umiranja ćelije: biohemijske i morfološke karakteristike, Zbornik predavanja XXIII seminara za inovacije znanja veterinara, 93-101, 2002. - 37. Ojeda S. R., Disson G.: Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors, *Trends Endocrinol. Metab.*, 5, 317-323, 1994. - 38. Yoshimura Y.: Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J. Obstet. Gynecol. Res.* 24, 305-323, 1998. - 39. Chun S. Y., Eisenhauer K. M., Minami S., Billig H., Perlas E., Hsueh A. J. W.: Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinol.* 137, 1447-1456, 1996. - 40. Chun S. Y., Billig H., Tilly J., Furuta I., Tsafiri A., Hsueh A. J. W.: Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous IGF-I. *Endocrinol.* 135, 1845-1853, 1994. - 41. Hernandez E. R., Roberts C. T. J., LeRoith D., Adashi E. Y.: Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinol.*, 136, 2770-2775, 1994. - 42. Liu X. J., Malkowski M., Guo Y., Erickson G. F., Shimasaki S., Ling N.: Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology*, 132, 1176-1183, 1993. - 43. Erickson G. F., Danmei L., Sadrkhanloo R., Liu X. J., Shimasaki S., Ling N.: Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone: stimulation of insulin-like growth factor-binding protein-4 and atresia. *Endocrinol.* 134, 1365-1372, 1994. - 44. Eisenhauer K. M., Chun S-Y., Billig H., Hsueh A. J. W.: Growth hormone suppression of ovarian follicle apoptosis and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). *Biol. Reprod.* 53, 13-20, 1999. - 45. Driancourt M. A., Thuel B.: Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 345-362, 1998. - 46. Baker S. J., Reddy E. P.: Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12, 1-9, 1996. - 47. Hakuno N., Koji T., Yano T., Kobayashi N., Tsutsumi O., Taketani Y., Nakane P. K.: Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinol.*, 137, 1938-1948, 1996. - 48. Krakauer D. C., Mira A.: Mitochondria and germ-cell death. *Nature* 400, 125-126, 1999. - 49. Bernardi P., Petronilli F. L., Forte M.: A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 112-117, 2001. - 50. D'Herde K., De Prest B., Mussche S., Schotte P., Beyaert R., Coster R.V., Roels F.: Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Cell Death Differ.* 7, 331-337, 2000. - 51. Tilly J. L., Tilly K. I.: Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinol.*, 136, 242-252, 1995. - 52.

De Pol A., Vaccina F., Forabosco A., Cavazzuti E., Marzona L.: Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 12, 2235-2241, 1997. - 53. Khan S. M., Daufenbach L. M., Yeh J.: Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 269-275, 2000. - 54. Muller Y., Rocchi E., Lazaro J. B., Clos J.: Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int.J. Dev. Neurosci.*, 13, 875-885, 1995. - 55. Singh R., Upadhyay G., Godbole M. M.: Hypothyroidism alters mitochondrial morphology and induces release of apoptogenic proteins during rat cerebellar development. *J. Endocrinol.* 176, 321-329, 2003. - 56. Vacca R. A., Moro L., Caraccio G., Guerrieri F., Marra E., Greco M.: Thyroid hormone administration to hypothyroid rats restores the mitochondrial membrane permeability properties. *Endocrinol.* 44, 3783-3788, 2003. - 57. Perez G. I., Robles R., Knudson C. M., Flaws J. A., Korsmeyer S. J., Tilly J.: Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Gen.* 21, 200-203, 1999. - 58. Tilly J. L., Kowalski K. I., Johnson A. L., Hsueh A. J. W.: Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol.*, 129, 2799-2801, 1991. - 59. Zeleznik A. J., Ihrig L. L., Bassett S. G.: Developmental expression of Ca^{++}/Mg^{++} -dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinol.* 125, 2218-2220, 1989. - 60. Boone D. L., Tsang B. K.: Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.*, 58, 1533-1539, 1998.

ENGLISH

APOPTOSIS AS FORM OF NATURAL OVARIAN CELL DEATH

Anita Radovanović, Jelka Stevanović, D. Gledić

Different hormones, cytokines, the absence of growth factors, and others, are some of the signals for initiating apoptosis in ovarian cells. Each of them, in its own way, trigger apoptosis as a form of death in which the cell actively participates by precisely implementing a genetically programmed sequence of biochemical and morphological changes which lead to selfdestruction. Apoptosis is a physiological form of death, which helps establish a dynamic balance among proliferation, differentiation, and death of ovarian cells.

It has been confirmed so far that follicular cells, oocytes, cells of the germinal epithelium, theca cells, and corpus luteum cells die through apoptosis. The physiological deaths of these cells are an integral part of normal ovarian function, both during intrauterine and postnatal life. Namely, during intrauterine ovarian development, about half the total number of germinative cells (future oocytes) die through apoptosis, and their population is gradually reduced after birth by so-called selection of follicles which will continue further growth (folliculogenesis) and the apoptosis of cells of those follicles which will be subjected to atresia. Most ovarian cells die by apoptosis continuously until the end of the reproductive life period of healthy females, and some can continue dying in this way until the death of the given individual (e.g. germinal epithelium cells).

Key words: ovarian cells, apoptosis.

АПОПТОЗ КАК СПОСОБ ПРИРОДНОГО ОТМИРАНИЯ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ

Анита Радованович, Елка Стеванович, Д. Гледич

Между сигналами для побуждения апоптоза в клетках яичников относятся разные гормоны, цитокины, отсутствие факторов роста и пр. Каждый из них, по-своему, побуждает апоптоз как форму смерти в которой клетка активно участвует так, что точно проводит генетическую программированную последовательность биохимических и морфологических изменений, которые её ведут в автодеструкцию. Апоптоз физиологическая форма смерти, с помощью которой обеспечивается установление динамического равновесия среди пролиферации, дифференциации и отмирания клеток яичников.

До сих пор подтверждено, что в яичниках апоптозом отмирают фолликулярные клетки, ооциты, клетки бациллового эпителия, клетки теки и жёлтого тела. Физиологическая смерть этих клеток составная часть нормальной функции яичников, как в течение внутриматочного развития яичников апоптозом отмирает около половины из совокупного числа герминативных клеток (будущих ооцитов), а после рождения их популяция постепенно уменьшается „отбором фолликулов”, которые продолжают более далёкое развитие (фолликулогенез) и апоптотическим отмиранием клеток тех фолликулов, которые подпадут атрезии. Большинство клеток отмирает апоптозом неразрывно до конца репродуктивного периода жизни здоровых самок, а некоторые могут отмирать этим способом всё до смерти отдельного животного (на пример клетки бациллового эпителия).

Ключевые слова: клетки, яичников, апоптоз

ZNAČAJ RAZLIČITIH VRSTA ŽIVOTINJA U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA ZA PROUČAVANJE HEMATOPOEZE *IN VIVO**

SIGNIFICANCE OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN EXPERIMENTAL MODELS FOR IN VIVO INVESTIGATIONS OF HEMATOPOIESIS

Milica Kovačević-Filipović, Tatjana Božić, Jelka Stevanović**

Do mnogobrojnih otkrića u medicini došlo se zahvaljujući eksperimentima na različitim vrstama životinja. Najčešće korišćene životinje u ispitivanjima procesa hematopoeze su laboratorijski miševi i pacovi, međutim i „velike” životinje, poput svinja, ovaca, mačaka, pasa i majmuna, evolutivno bližih ljudima, imaju svoje mesto u eksperimentalnoj hematologiji. Specifična problematika određene vrste životinja može da dovede do fundamentalnih saznanja o pojedinim aspektima procesa hematopoeze i biologiji matičnih ćelija hematopoeze. Takođe, uporedno ispitivanje pojedinih fenomena kod različitih vrsta pomaže u sagledavanju opštih zakonitosti u živom svetu. U domenu pretkliničkih ispitivanja životinjski modeli su nezaobilazni korak u izučavanju transplantacione biologije matičnih ćelija hematopoeze, kao i u izučavanju biološki aktivnih molekula sa efektom na hematopoetski sistem. Saznanja dobijena na životinjskim modelima imaju svoju primenu i u humanoj i u veterinarskoj medicini.

Ključne reči: životinje, eksperimentalni modeli, hematopoeza

Uvod / Introduction

Ograničen životni vek zrelih ćelija krvi uslovljava potrebu za njihovim neprekidnim obnavljanjem koje se odvija procesom hematopoeze. Tokom ovog procesa iz malog broja primitivnih, pluripotentnih matičnih ćelija hematopoeze (PMČH), preko niza razvojnih stadijuma i pod dejstvom različitih faktora, neprekidno nastaju sve ćelije krvi. Aktuelna istraživanja na polju hematopoeze su us-

* Rad primljen za štampu 5. 3. 2004. godine

** Mr Milica Kovačević-Filipović, asistent, dr Tatjana Božić, redovni profesor, Katedra za patološku fiziologiju, dr Jelka Stevanović, vanredni profesor, Katedra za fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

merena na ispitivanja funkcionalnih osobina PMČH *in vitro* i *in vivo*, kao i njihovih karakteristika na molekularnom i biohemijskom nivou, a u cilju različitih i sve mnogobrojnijih mogućnosti njihove primene u terapiji hematoloških i nehematoloških malignih bolesti, zatim autoimunih bolesti, imunodeficijencija i drugih.

Ispitivanja biologije matičnih ćelija hematopoeze, kao i ispitivanja mogućnosti kliničke primene saznanja dobijenih fundamentalnim istraživanjima, odvijaju se na različitim vrstama životinja. Prvi korak u fundamentalnim istraživanjima, kao i u definisanju promena koje nastaju kod različitih bolesti hematopoetskog sistema i eventualnim mogućnostima terapije, predstavljaju *in vitro* test sistemi, kako iz etičkih tako i iz ekonomskih razloga. Zatim slede ispitivanja *in vivo*, odnosno koriste se različiti eksperimentalni modeli fizioloških i patoloških procesa i ispituju se mogući načini terapija, upravo na „malim” i „velikim” eksperimentalnim životinjama. S druge strane, vrlo često pre, a najčešće paralelno ili neposredno posle uspostavljanja određenog protokola za terapiju kod ljudi, dolazi do njegove primene i u veterinarskoj medicini. Upravo iz tog razloga u ovom radu je opisan značaj pojedinih eksperimentalnih životinjskih modela u ispitivanjima vezanim za proces hematopoeze.

Istorijat, metode i značaj proučavanja hematopoeze /

History, methods and significance of hematopoiesis studies

Prva zapažanja o nastanku krvnih ćelija, krajem 19. veka, bila su u domenu deskriptivne citologije i odnosila su se na morfologiju prethodnika zrelih ćelija krvi koji se nalaze u kostnoj srži. Veliki broj tih ćelija u mitozu naveo je na zaključak da se proces stvaranja krvnih ćelija odvija upravo na tom mestu. Međutim, s obzirom na skromne tehničke mogućnosti tadašnjih istraživača, svet malobrojnih i morfološki neprepoznatljivih, ali vrlo moćnih matičnih ćelija, morao je još malo da sačeka da bude otkriven. Prve pretpostavke o postojanju i prirodi matičnih ćelija, početkom 20. veka, dali su Maksimov i Vera Daničkova, formulišući monofiletičku teoriju po kojoj sve ćelije krvi imaju zajedničko poreklo. Najraniji dokazi o organizaciji hematopoetskog sistema dobijeni su sredinom 20. veka, primenom radijacione biologije i *in vivo* modela [50 i 64] na kojima je bilo moguće ispitivanje matičnih ćelija hematopoeze na osnovu njihovih funkcionalnih osobina. Tako je ustanovljeno da se 7-14 dana nakon transplantacije singene kostne srži letalno ozračenom mišu u slezini razvijaju kolonije nezrelih ćelija krvi. One nastaju od pluripotentnih matičnih ćelija nazvanih *colony forming unit – spleen* (CFU-S) koje su tada smatrane najprimitivnijim PMČH [65]. Kasnije je pokazano da CFU-S ne pripadaju kategoriji najprimitivnijih PMČH. Paralelan razvoj brojnih *in vivo* modela i *in vitro* sistema za kultivaciju ćelija, dali su kasnijih godina jasniju sliku toka hematopoeze. Tako je utvrđeno da se odeljak matičnih ćelija svih ispitivanih vrsta životinja sastoji od niza ćelija različitog stepena zrelosti. Najprimitivnije među PMČH imaju najveći kapacitet samoobnove sopstvene populacije, veliki proliferativni potencijal i mogućnost za diferentovanje u sve loze krvnih

ćelija, kao i mogućnost kompletne i trajne obnove hematopoeze kod primaoca sa suprimiranom sopstvenom hematopoezom. Sazrevanje ovih ćelija vodi opadanju mogućnosti samoobnove, ograničavanju proliferativnog potencijala i mogućnosti diferentovanja, ali rezultira povećanjem proliferativne aktivnosti [32, 49, 51, 52].

Proces hematopoeze se odvija u mikrosredini kostne srži koja ima ključnu ulogu u njenoj regulaciji. Mikrosredina hematopoeze podrazumeva funkcionalno jedinstvo stromalnih ćelija i njihovih proizvoda (molekuli međucelijske supstance i biološki aktivni molekuli) koji imaju stimulatorna [53] i/ili inhibitorna dejstva [47, 48, 56, 68]. Među biološki aktivnim molekulima koji regulišu proces hematopoeze nalaze se citokini u koje se ubrajaju faktori rasta (G-CSF*, GM-CSF**), eritropoetin [12] i razni drugi citokini kao što su IL-1 i IL-6 [39, 60]. Jedan od uslova mikrosredine koji ima veliki uticaj na matične ćelije hematopoeze je i parcijalni pritisak kiseonika [35, 60]. U ostale faktore neophodne za normalno odvijanje procesa hematopoeze ubrajaju se različiti mikroelementi, vitamini i hormoni [28, 57].

Dinamika hematopoeze zdravih jedinki je uvek dobro prilagođena potrebama organizma. Tako, na primer, hipoksija tkiva stimuliše stvaranje eritropoetina [58], koji obezbeđuje proliferaciju i preživljavanje većeg broja matičnih ćelija eritrocitopoeze i nastanak većeg broja eritrocita, čime se uspostavlja bolje snabdevanje tkiva kiseonikom koje je u početku bilo narušeno hipoksijom. Opsežno oštećenje tkiva i posledični razvoj zapaljenjske reakcije dovodi do oslobađanja proinflammatoryh medijatora (na primer, IL-1 i IL-6) koji stimulišu kostnu srž na proizvodnju većeg broja mladih granulocita i monocita [37, 54, 59] koji treba da uklone štetne agense i ćelijski detritus, kao i da pokrenu obnovu oštećenog tkiva. Takođe, deficit pojedinih materija, trovanje i jonizujuće zračenje takođe se odražavaju na promene u broju i funkcionalnoj aktivnosti krvnih ćelija [13, 14].

Centralno mesto u regulaciji procesa hematopoeze pripada citokinima. Mnogi od njih su otkriveni zahvaljujući *in vitro* kulturama matičnih ćelija. Razvoj genetskog inženjeringa doveo je do sinteze rekombinantnih citokina, čija je biološka aktivnost definisana brojnim *in vivo* ispitivanjima kako bi postali dostupni i za kliničku primenu. Tako se danas eritropoetin koristi i u humanoj [38] i u veterinarskoj medicini [61] u svim stanjima kada je njegova sinteza nedovoljna zbog oštećenja bubrega. Jedna od kliničkih primena G-CSF i GM-CSF je u okviru protokola za mobilizaciju matičnih ćelija kostne srži u perifernu krv i njihovu kasniju transplantaciju [9]. Najperspektivnija primena velikog broja citokina je njihova upotreba za *ex vivo* ekspanziju matičnih ćelija hematopoeze koja bi trebala da obezbedi uspešniju, kvalitetniju i bezbedniju transplantaciju ovih ćelija [18, 31]. Međutim, konačan broj ovih faktora nije definitivno utvrđen, kao što nisu u potpu-

* G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) Faktor koji stimuliše rast granulocitnih kolonija.

** GM-CSF (*Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor*) Faktor koji stimuliše rast granulocitno - monocitnih kolonija.

nosti razjašnjeni ni svi njihovi *in vivo* efekti. Neprekidno se otkrivaju novi citokini i dopunjuju se ili menjaju shvatanja o onima koji su već otkriveni, a jedan od nezao-bilaznih stadijuma, pre njihove eventualne kliničke primene je testiranje, ne samo *in vitro* nego i *in vivo*, upravo na životinjskim eksperimentalnim modelima.

Eksperimentalni modeli u hematologiji / *Experimental models in hematology*

Uspešnim modelom u biomedicinskim istraživanjima smatra se onaj koji podražava stanja u zdravom ili bolesnom ljudskom ili životinjskom organizmu, u kome se detaljno mogu da prate različiti fiziološki i patofiziološki procesi. Međutim, realno je očekivati da nijedan eksperimentalni model ne može u potpu-nosti da zadovolji sve potrebe istraživača. Takođe, često se dešava da se baš su-miranjem podataka dobijenih na specifičnostima pojedinih modela može da dođe do kompletnog rešenja nekog problema.

Interesovanje za detaljnu analizu i proučavanje hematopoeze kod različitih vrsta životinja važno je za utvrđivanje fundamentalnih procesa funkcionisanja živog sveta. Takođe, podjednako je važno i sa stanovišta uspostavljanja ži-votinjskih modela koji bi poslužili za utvrđivanje principa dijagnostike i terapije različitih oboljenja sistema za hematopoezu, odnosno i samih matičnih ćelija. Ispi-tivanje PMČH nije moguće bez *in vivo* eksperimenata na životinjama, jer ne pos-toje *in vitro* sistemi u kojima se u potpunosti mogu da ispolje njihove funkcionalne osobine.

Najintenzivnija istraživanja u domenu hematopoeze obavljaju se na **mišu**. Razloga za to ima više, a jedan od njih je visoka srodnost sojeva laborato-rijskih miševa koja omogućava dobijanje reproducibilnih rezultata i olakšava donošenje zaključaka radi objašnjenja određenih pojava. Osim toga, mala tele-sna masa ovih životinja omogućava testiranje relativno malih količina biološki ak-tivnih molekula na velikom broju pojedinačnih uzoraka. Savremene tehnologije obezbedile su uslove izvođenja izuzetno suptilnih poduhvata, kao što je ciljano izazivanje mutacija na životinjama (transgene ili „knock-out” životinje), koje pruža-ju mogućnosti ispitivanja pojedinih parametara *in vivo*, ne isključujući kom-pleksnost živog organizma, što svakako daje preciznije podatke o njihovim ulogama u odnosu na one dobijene *in vitro*. Zahvaljujući takvim modelima shvaće-na je, na primer, važnost pojedinih adhezivnih molekula, citokina, hemokina i nji-hovih receptora angažovanih u kontroli hematopoeze. Takođe, miš je jedna od dve životinjske vrste na kojima je trenutno moguće proučavati PMČH ljudi posle ksenotransplantacije (druga vrsta životinja su ovce – opisano dalje u tekstu). Naime, specifična vrsta miševa sa kombinovanom imunodeficijencijom (NOD/SCID*) čini humanu hematopoezu dostupnu proučavanju *in vivo*, jer se ne

* NOD/SCID je skraćenica za englesku složenicu *non-obese diabetic/severe combined immu-nodeficiency*, koja bi mogla da se prevede kao nekojzane dijabetične životinje sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom.

razvija imunološka reakcija posle transplantacije PMČH ljudi čime se obezbeđuje njihova samoobnova, proliferacija i diferencijacija [31].

Paralelno sa izuzetno opsežnim istraživanjima na miševima obavljena su istraživanja i na pacovima kao „malim” eksperimentalnim životinjama [12]. Ostale životinjske vrste su uključivane u eksperimente sa nastojanjem razvijanja eksperimentalnih modela na „velikim” životinjama, koje bi specifičnom patologijom, sa jedne i evolutivnom bliskošću sa ljudima, sa druge strane, omogućile dalje i podrobnije razumevanje fizioloških i patofizioloških tokova hematopoeze, sve u cilju rešavanja kliničke problematike. Potreba za „velikim” životinjama postoji i kada se testiraju glavni i neželjeni efekti aktivnog principa i farmakodinamika i farmakokinetika potencijalnih lekova u terapiji hematoloških poremećaja.

Još od samog početka uvođenja *in vitro* metoda za ispitivanje matičnih ćelija hematopoeze, u istraživanja su uključene **ovce** [71], koje su danas važne eksperimentalne životinje za proučavanje PMČH ljudi *in vivo*. Naime, Zanjani i saradnici [72] na ovci su razvili metodologiju *in utero* transplantacije humanih matičnih ćelija fetusima, kod koje se prihvatanje kalema odvija bez reakcije domaćina, s obzirom na preimuni status fetusa [62]. Prednost modela hematopoeze himere na velikoj životinji u odnosu na miša, je mogućnost kontinuiranog uzimanja veće količine uzoraka, i lakše detekcije i praćenja antigenski različitih matičnih ćelija donora (najčešće čoveka). Serija eksperimenata izvedenih na ovom modelu doprinela je definisanju adhezivnih molekula koji, pod fiziološkim uslovima, obezbeđuju prelazak matičnih ćelija iz krvi u kostnu srž [73]. Prednost ovog modela je mogućnost praćenja matičnih ćelija ljudi i njihovu diferencijaciju tokom niza godina, ne samo na istoj životinji, već i na njenim potomcima [24]. Poslednja istraživanja objavljena na opisanom modelu ovce odnose se na dokazivanje **plastičnosti** matičnih ćelija hematopoeze, odnosno mogućnosti promene njihovih funkcionalnih i morfoloških osobina zavisno od mikrosredine u kojoj se nalaze [8]. Jedan od primera plastičnosti je transformacija primitivnih matičnih ćelija za hematopoezu u matične ćelije nervnog ili mišićnog tkiva [8].

Psi su životinje koje su se među prvim koristile u eksperimentalnoj hematologiji i još uvek se koriste u ispitivanjima vezanim za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze. Još 1600. godine William Harvey je na psu izveo transfuziju krvi. Zatim su usledili brojni bazični i preklinički eksperimenti u oblasti radijacione biologije i ispitivanja efekata zračenja na kostnu srž, matične ćelije hematopoeze i na maligne bolesti hematopoetskog sistema [16, 46]. Razumevanje patofiziologije ciklične hematopoeze, specifičnog autozomnog recesivnog oboljenja koje se javlja i kod ljudi, obezbeđeno je upravo izučavanjem ovog oboljenja kod pasa rase grej koli. Naime, ustanovljeno je da se promene u broju različitih vrsta krvnih ćelija javljaju sa neverovatnom pravilnošću, a da se na istovetan način menja i broj opredeljenih matičnih ćelija, odnosno da se radi o poremećaju matičnih ćelija [4].

Sigurno najznačajnija uloga pasa kao eksperimentalnih životinja u istraživanjima procesa hematopoeze leži u proučavanju autologe i alogene trans-

plantacije matičnih ćelija hematopoeze [40], zatim u izučavanju reakcije kalema protiv domaćina prilikom transplantacije [63] i u ispitivanju mogućnosti primene hematopoetskih faktora rasta i genske terapije u lečenju teške kombinovane imunodeficijencije [70]. Upravo rezultati tih i drugih istraživanja doveli su do primene G-CSF u nekoliko terapijskih protokola. Naime, danas se G-CSF koristi za skraćivanje trajanja neutropenije izazvane hemoterapijom malignih oboljenja, zatim za ubrzanje porasta broja neutrofila posle transplantacije kostne srži, za mobilizaciju matičnih ćelija kostne srži u krv, kao i za tretman teških hroničnih neutropenija (na primer, kod nekih imunodeficientnih stanja). Pri tom se G-CSF na isti način primenjuje u humanoj i veterinarskoj medicini [29, 55]. U kliničkim protokolima za lečenje malignih bolesti pasa poslednjih godina sve više se primenjuje transplantacija matičnih ćelija hematopoeze koja je omogućena upravo *in vivo* ispitivanjima na samim psima [26].

Najopsežnija, vrlo sistematična, ispitivanja na **mačkama** odnose se na problematiku održavanja hematopoeze aktivacijom primitivnih matičnih ćelija. Naime, Abkowitz i saradnici su nizom eksperimenata [3, 5, 6, 7] dali dokaz *teorije klonске sukcesije*, po kojoj hematopoezu održavaju populacija aktivnih matičnih ćelija i populacija ćelija u neaktivnoj fazi ćelijskog ciklusa – rezerva koja se povremeno aktivira. Suprotno gledište je da se samoobnovom određene populacije matičnih ćelija može da održava hematopoeza do kraja života. Tokom ovog ispitivanja korišćen je specifičan eksperimentalni model mačke na kome je, praćenjem odgovarajućih izotipova enzima, zaključeno da se hematopoeza održava zahvaljujući stohastičkom uključivanju pojedinih klonova matičnih ćelija u diferencijaciju ka zrelijim stadijumima. Isti autori su, takođe, na modelu mačke, došli do zaključka da mačka, miš i čovek imaju u organizmu isti broj matičnih ćelija, kao i da je ta karakteristika dobro konzervirana kroz evoluciju [2].

Velike sličnosti sa ljudima čine **majmune** značajnim eksperimentalnim životinjama u oblasti tehnologije genskog transfera i u pretkliničkim ispitivanjima različitih pristupa transplantacije matičnih ćelija hematopoeze i njihove *ex vivo* ekspanzije [15, 27, 30, 67]. Naime, iako je broj matičnih ćelija kod svih vrsta sisara isti, učestalost samoobnove i ulazak u ćelijski ciklus ovih ćelija je značajno različit u zavisnosti od veličine životinje i dužine njenog života [2]. Tako se PMČH miša mnogo češće dele i brže „troše” nego iste ćelije mačke, dok se ove ćelije mačke troše brže nego kod majmuna i ljudi. Usled ovakve razlike u aktivnosti matičnih ćelija, koja ima direktan uticaj i na tehnologiju genskog transfera i na njihovu transplantaciju, majmuni su mnogo prihvatljiviji model za rešavanje praktičnih aspekata pomenute problematike.

Što se tiče ispitivanja specifičnih oboljenja, i kod **majmuna** i kod **mačaka** su dokazana oboljenja izazvana retrovirusima koji dovode do patoloških promena analognih aplastičnoj anemiji i sindromu stečene imunodeficijencije ljudi (SIDA). Ispitivanje efekta navedenih virusa na hematopoezu ovih životinja, kao i ispitivanje različitih oblika terapije svakako može da ima značaj za analoge ovih oboljenja ljudi [1, 17, 25].

Svinja je danas široko prihvaćena eksperimentalna životinja u bio-medicinskim istraživanjima. Iako su svinje u poređenju sa visokosrodnim sojevima miševa, genetski heterogena populacija, njihove fiziološke karakteristike kao što su veličina, dijetetske navike, funkcionisanje gastrointestinalnog sistema, kože, bubrega, struktura plućnog krvotoka, raspored koronarnih arterija i sklonost ka gojenju po kojima su slične ljudima, za istraživanja ih čine zanimljivijim od miševa i drugih eksperimentalnih životinja. [66]. Tokom niza godina istraživanja [20, 21, 22, 23], Emery i saradnici su na minijaturnim svinjama razvijali dva modela transplantacije matičnih ćelija hematopoeze koji bi bili pogodni za indukciju specifične tolerancije primaoca prema potencijalnom transplantatu.

Ipak u okviru hematoloških istraživanja, svinje su pretežno uključene u eksperimente u vezi sa anemijom nastalom usled deficita gvožđa [19]. Međutim, u dosadašnjoj literaturi hematopoeza svinje nije obrađena sa stanovišta *hematopoeze* i *specifične patologije* koja se odnosi na anemiju prasića nastalu usled deficita gvožđa. Regulacija metabolizma gvožđa i regulacija hematopoeze u uslovima njegovog deficita su oblasti koje još uvek nisu do kraja ispitane ni u humanoj patologiji. Anemija nastala usled deficita gvožđa još uvek predstavlja izuzetno rasprostranjen poremećaj i kod ljudi i kod životinja. Izučavanja ovog tipa anemije na eksperimentalnim modelima pokazala su da je gvožđe važno ne samo za sintezu hemoglobina, nego i za funkcionisanje regulatornih mehanizama na nivou „limfoidne” regulacije eritrocitopoeze [11, 69]. Takođe, veoma izražen deficit gvožđa može da poremeti elementarne metaboličke procese i tako dovede do zastoja u proliferaciji matičnih ćelija hematopoeze [34]. Reakcija kompletnog hematopoetskog sistema na nedostatak gvožđa još uvek nije u dovoljnoj meri izučena. Bannerman [10] naveo je pet genetski uzrokovanih sindroma poremećaja metabolizma gvožđa kod životinja i ljudi, čija su istraživanja dovela do novih saznanja. Među tim modelima se nalazi i beogradski anemični (b/b) pacov koji se pokazao pogodnim, ne samo za izučavanje eritrocitopoeze i hematopoeze [33, 36], već i za rešavanje fundamentalnih problema vezanih za sintezu eritropoetina [34].

Saradnjom Fakulteta veterinarske medicine i Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu razvijena je metodologija kultivacije opredeljenih matičnih ćelija iz krvi i kostne srži svinje [41]. Dobijeni rezultati pokazuju da su broj opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitopoezu i granulo-monocitopoezu u krvi i kostnoj srži svinje istog reda veličine kao i kod drugih ispitivanih životinja i kod ljudi [42, 43]. Takođe, procenat opredeljenih matičnih ćelija koje se nalaze u aktivnoj fazi ćelijskog ciklusa odgovara ovom parametru kod drugih vrsta sisara, što ukazuje da je ustrojstvo hematopoetskog sistema konzervirano kroz evoluciju [44]. Primenom utvrđene metodologije [45] dobijene su i informacije o matičnom odeljku hematopoeze i njenoj humoralnoj regulaciji kod prasića sa anemijom izazvanom nedostatkom gvožđa, koje ukazuju na kvalitativne poremećaje u odeljku opredeljenih matičnih ćelija (neobjavljeni rezultati – Kovačević). Dalja istraživanja na ovom planu mogla bi da upotpune dosadašnja saznanja stečena

izučavanjem sličnih anemija čoveka i životinja. Uz to bi, ovakav metodološki pristup ispitivanju matičnog odeljka hematopoeze svinja omogućio, sam za sebe, kvalitativno nov pomak u izučavanju patofiziologije ove životinje.

Zaključak / Conclusion

Do mnogobrojnih otkrića u hematologiji došlo se zahvaljujući eksperimentima na različitim vrstama životinja. Potreba za neprekidnim definisanjem i uspostavljanjem novih eksperimentalnih modela je opravdana, jer se samo sagledavanjem nekog problema iz različitih uglova može doći do njegovog pravog rešenja. Zato može da se kaže da je uvođenje u istraživanja „velikih” eksperimentalnih životinja, poput svinja, ovaca, mačaka, pasa i majmuna, neophodno, kako sa stanovišta rešavanja specifične problematike određene vrste, tako i u sagledavanju opštih zakonitosti u živom svetu. Nesumljivo krajnji motiv svih istraživanja je primena dobijenih rezultata radi unapređenja terapije, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini.

Literatura / References

1. Abkowitz J. L.: Retrovirus-induced feline pure red blood cell aplasia: pathogenesis and response to suramin. *Blood*, 77, 1442-1451, 1991. - 2. Abkowitz J. L., Catlin S. N., McCallie T. M., Gutter P.: Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*, 100, 2665-2667, 2002. - 3. Abkowitz J. L., Catlin S. N., Gutter P.: Evidence that hematopoiesis may be stochastic *in vivo*. *Nat. Med.*, 2, 190-197, 1996. - 4. Abkowitz J. L., Holly R. D., Hammond W. P.: Cyclic hematopoiesis in dogs: studies of erythroid burst forming cells confirm an early stem cell defect. *Exp. Hematol*, 16, 941-945, 1988. - 5. Abkowitz J. L., Linenberger M. L., Newton M. A., Shelton G. H., Ott R. L., Gutter P.: Evidence for the maintenance of hematopoiesis in a large animal by the sequential activation of stem cell clones, 87, 9062-9066, 1990. - 6. Abkowitz J. L., Ott R. M., Holly R. D., Adamson J. W.: Clonal evolution following chemotherapy-induced stem cell depletion in cats heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood*, 71, 1687-1692, 1988. - 7. Abkowitz J. L., Persik M. T., Shelton G. H.: The behaviour of hematopoietic stem cells in large animal. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 2031-2035, 1995. - 8. Almeida-Porada G., Zanjani E. D.: A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells, Molecules and Disease*, 32, 77-81, 2004. - 9. Balint B., Ivanović Z.: Transplantacija matičnih ćelija mobilisanih u perifernu krv. *Bilten za transfuziologiju*, 23, 5-11, 1995. - 10. Bannerman R. M.: Genetic defects of iron transport. *Fed. Proc*, 35, 2281-2285, 1976. - 11. Bazarnyi V. V., Iastrebov A. P.: Disordered lymphoid regulation of hematopoiesis in iron-deficiency anemia. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter*, 3, 34-36, 1991. - 12. Biljanović-Paunović L., Clemons G. K., Ivanović Z., Pavlović-Kentera V.: Erythropoietin and erythroid progenitors in rats exposed to chronic hypoxia. *Indian J. Med. Res*, 104, 304-310, 1996. - 13. Božić Tatjana, Stevanović Jelka, Kovačević Milica, Jović S., Lukić S., Petakov M., Borozan Sunčica, Mijačević Zora, Knežević Milijana, Bulajić S.: Toluene mediated oxidative stress and granulomonocytopoiesis. *Acta Vet*, 53, 201-211, 2003. - 14. Božić Tatjana, Stevanović Jelka, Kovačević-Filipović Milica, Jović S., Popović D., Todorović D.: Possible effects of depleted uranium (DU) on peripheral blood and biochemical parameters in cattle. 5th Regional Conference on Environment and Food Quality, 4-5 September, Book of Abstracts, 25, 2003. - 15. Brandt J. E., Bartholomew A. M., Fortman J. D., Nelson M. C., Bruno E., Chen L. M., Turian

- J. V., Davis T. A., Chute J. P., Hoffman R.: Ex Vivo Expansion of Autologous Bone Marrow CD34⁺ Cells With Porcine Microvascular Endothelial Cells Results in a Graft Capable of Rescuing Lethally Irradiated Baboons Blood, 94, 106-113, 1999. - 16. Cowall D. E., MacVittie T. J., Parker G. A., Weinberg S. R.: Effects of low-dose total-body irradiation on canine bone marrow function and canine lymphoma. *Exp. Hematol*, 9, 581-587, 1981. - 17. Dornsife R. E., Gasper P. W., Mullins J. I., Hoover E. A.: *In vitro* erythrocytopathic activity of an aplastic anemia-inducing feline retrovirus. *Exp. Hematol*, 17, 138-144, 1989. - 18. Duchez P., Dazey B., Douay L., Vezon G., Ivanovic Z.: An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34⁺ cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 12, 587-589, 2003. - 19. Egeli A. K., Framstad T.: An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res Vet Sci*, 66, 179-184, 1999. - 20. Emery D. W., Shafer E. M., Karson E. M., Sachs D. H., Leguern C.: Expression of allogeneic Class II cDNA in swine bone marrow cells transduced with a recombinant retrovirus. *Transplantation Proc*, 24, 468-69, 1992. - 21. Emery D. W., Sablinski T., Arn J. S., LeGuern C., Sachs D. H.: Bone marrow culture and transduction of stem cells in miniature swine model. *Blood Cells*, 20, 498-503, 1994. - 22. Emery D. W., Sach D. H., LeGuern C.: Culture and characterization of hematopoietic progenitor cells from miniature swine. *Exp. Hematol*, 24, 927-935, 1996. - 23. Emery D. W., Shafer E. M., Karson E. M., Sachs D. H., Leguern C.: Retrovirus mediated transfer and expression of allogeneic major histocompatibility complex class II DRB cDNA in swine bone marrow cultures. *Blood*, 81, 2460-2465, 1993. - 24. Flake A. W., Zanjani E. D.: In utero Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Ontogenic Opportunities and Biologic Barriers. *Blood*, 99, 2179-2191, 1999. - 25. Franchini G.: Modeling immune intervention strategies for HIV-1 infection of humans in the macaque model The introduction of potent antiretroviral therapy (ART) has generated hope and prospects in the management of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 3, 289-306, 2003. - 26. Frimberger A. E., Moore A. S., Quinsberry P. J.: Bone Marrow Transplantation-Based Experimental Therapies for Canine. In *Gene, Dogs and Cancer: Emerging Concepts in Molecular Diagnosis and Therapy*, J. F. Modiano (ed). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2001. - 27. Geissler K., Mayer P., Liehl E., Hinerberger W., Lechner K., Bettelheim P.: Recombinant human IL-3 expands the pool of circulating hematopoietic progenitor cells in primates-sinergism with recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *Blood*, 75, 2305-2310, 1990. - 28. Gvozdić D., Božić T., Ivanović Z., Stefanović J., Jelkmann W.: Thyroid gland function in the Belgrade laboratory (b/b) rat. *Acta Vet*, 47, 277-282, 1997. - 29. Hammond W. P., Csiba E., Canin A., Hockman H., Souza L., Layton J. E., Dale D. C.: Chronic neutropenia-A new canine model induced by humane granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Invest*, 87, 704-710, 1991. - 30. Hanazono Y., Terao K., Ozawa K.: Gene transfer into nonhuman primates hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells*, 19, 12-23, 2001. - 31. Heike T., Nakahata T.: *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells by cytokines, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1592, 313-321, 2002. - 32. Hodgson G. S., Bradley T. R.: Properties of haemopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature*, 281-381, 1979. - 33. Ivanović Z., Milenković P.: The seeding efficiency of normal and hereditarily anemic (b/b) rat bone marrow colony forming units-Spleen as determined in a „rat to mouse” assay. *Stem Cells*, 13, 666-670, 1995. - 34. Ivanović Z.: Hematopoietic stem cell proliferation in Belgrade rats: to complete the parable. 39, 307-316, 1997. - 35. Ivanović Z., Belloc F., Faucher J. L., Cipolleschi M. G., Praloran V., Dello Sbarba P.: Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol*, 30, 67-73, 2002. - 36. Ivanović Z., Milenković P., Vasilijevska M., Dekić M.: Hematopoietic stem cells in the hereditary anemic Belgrade laboratory (b/b) rat. *Exp. Hematol*, 23, 1218-1223, 1995. - 37. Ivanović Z.: Regulacija proliferacije pluripotentnih matičnih ćelija u toku sterilne inflamacije. Magistarska teza, 1992. - 38. Jones

- M., Ibels L., Schenkel B., Zagari M.: Impact of epoetin alfa on clinical end points in patients with chronic renal failure: A meta-analysis. *Kidney Int*, 6, 757-67, 2004. - 39. Jovčić G., Ivanović Z., Biljanović-Paunović L., Bugarski D., Stošić-Grujić S., Milenković P.: *In vivo* effects of interleukin-1, receptor antagonist on hematopoietic bone marrow progenitor cells in normal mice. *Eur. Cytokine. Netw.*, 7, 71-74, 1996. - 40. Kiem H. P., Sellers S., Thomasson B., Morris J. C., Tisdale J. F., Horn P. A., Hematti P., Adler R., Kuramoto K., Calmels B., Bonifacino A., Hu J., von Kalle K., Schmidt M., Sorrentino M., Nienhuis A., Blau A. C., Andrews R. G., Donahue R. E., Dunbar C. E.: Long-Term Clinical and Molecular Follow-up of Large Animals Receiving Retrovirally Transduced Stem and Progenitor Cells: No Progression to Clonal Hematopoiesis or Leukemia. *Molecular Therapy*, 1525-0016(03)00408-8, 2004. - 41. Kovačević Milica: Kultivisanje matičnih ćelija hematopoeze iz krvi i kostne srži svinje. Magistarska teza, 1998. - 42. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Ivanović Z.: Erythroid progenitor cells from pig bone marrow and peripheral blood. *Veterinary Journal*, 158, 196-203, 1999. - 43. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Jovčić G., Petakov M., Bugarski D., Stanković J., Ivanović Z.: Pig bone marrow and peripheral blood granulocyte-macrophage progenitor cells. *Acta Veterinaria* 51, 15-26, 2001. - 44. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Pavlović V., Petakov M., Bugarski D., Jovčić G., Ivanović Z.: Pig bone marrow and peripheral blood erythroid progenitor cells in S phase of the cell cycle. *Acta Veterinaria* 50, 207-214, 2000. - 45. Kovačević M., Jovčić G., Božić T., Petakov M., Pavlović V.: Metod kultivacije matičnih ćelija hematopoeze iz kostne srži svinje i deo - matične ćelije određene za eritropoezu. *Veterinarski glasnik*, 1999. - 46. Kreja L., Weinsheimer W., Northdurf W.: *In vitro* studies on the radiosensitivity of multipotent hemopoietic progenitors in canine bone marrow. *Exp. Hematol.*, 19, 755-775, 1991. - 47. Liu J. M., Bignon J., Lawrence F., Meric P., Kovacevic M., Papadimitriou E., Katsoris P., Fromes Y., Wdzieczak-Bakala J.: The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, controls normal and pathological angiogenesis 32. Annual Meeting of Experimental Hematology 3-8 July. *Experimental Hematology* 31 supplement 215, 2003. - 48. Liu J. M., Lawrence F., Kovačević M., Bignon J., Papadimitriou E., Lallemand J. Y., Katsoris P., Potier P., Fromes Y., Wdzieczak-Bakala J.: The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 10, 3014-3020, 2003. - 49. Lord B. I.: Biology of the haemopoietic stem cell. *Stem Cells*, 401-422, 1997. - 50. McCulloch E. A., Till J. E.: The radiation sensitivity at normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Rad. Res*, 13, 115-125, 1960. - 51. McNiece I. K., Bertoncello I., Kriegler A. B., Quesenberry P. J.: Colony forming cells with high proliferative potential (Hpp-CFC). *Int. J. Cell. Cloning*, 8, 146-160, 1990. - 52. Metcalf D.: Some general aspects of hematopoietic cell development. In *Hematopoiesis: A Developmental Approach* (Zon, L.I. ed) Oxford University Press. 136, 2001. - 53. Migliaccio G., Migliaccio A. R., Visser J. W. M.: Synergism between erythropoietin and IL-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. *Blood*, 72, 944-951, 1988. - 54. Milenković P., Ivanović Z., Lukić M. L., Kataranovski M., Lord B. I.: Stimulator of proliferation of spleen colony forming cells in acute inflammation. *Cell. Prolif.* 26, 503, 1993. - 55. Mishu L., Callahan G., Allebban Z., Maddux J. M., Boone T. C., Souza L. M., Lothrop C. D.: Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. *JAVMA* 200, 1957-1964, 1992. - 56. Paukovits W. R., Laerum O. D.: Isolation and synthesis of a hemoregulatory peptide. *Z Naturforsch.* 37, 1297, 1982. - 57. Pavlović-Kentera V., Đurić O., Sušić S.: Sex hormones status and erythropoietin production in rats. *Endocrin. Exp.* 13, 163-68, 1979. - 58. Pavlović-Kentera V., Hall D. P., Bragassa C., Lange R.: Unilateral renal hypoxia and production of erythropoietin. *J. Lab. Clin. Med.*, 65, 577-587, 1965. - 59. Petakov M., Biljanovic-Paunovic L., Jovcic G., Stojanovic N., Todorovic V., Jelkmann W.: The influence of acute sterile inflammation on erythropoiesis in rats. *Exp Hematol.*, 26, 222-227, 1998. - 60. Petakov M., Kovačević M., Jovčić G., Bugarski D., Milenković P., Stojanović N., Praloran V., Ivanović Z.:

Uticaj IL-6 na primitivne matične ćelije hematopoeze u uslovima hipoksije. 9. kongres hematologa Jugoslavije, Beograd 16-19. novembar, 2002. - 61. Randolph J. E., Scarlett J., Stokol T., MacLeod J. N.: Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. J Vet Intern Med. 18, 81-89, 2004. - 62. Srour E. F., Zanjani E. D., Brandt J. E., Leemhuis T., Briddell R. A., Heerema N. A., Hoffman R.: Sustained Human Hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult bone marrow cell. Blood, 79, 1404-1412, 1992. - 63. Storb R., Thomas E. D.: Graft-versus-host diseases in dog and man: The Seattle experience, in Moller G (ed): Immunological Reviews No 88. Copenhagen, Denmark, Munksgaard, 215, 1985. - 64. Till J. E., McCulloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad Res, 14, 213, 1961. - 65. Till J. E., McCulloch E. A., Siminovich D.: A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 5, 29-36, 1964. - 66. Tumbleson i Schook: Advances in Swine Biomedical Research. ed Tumblesone and Schook, Plenum Press, New York, 1, 1996. - 67. van Beuscechem, Kukler V. W., Heidt P. J.: Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkey transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7640, 1992. - 68. Wdzieczak-Bakala J., Guignon M., Lenfant M., Friendel E.: Further purification of a CFU-S inhibitor: in vivo effects after cytosine arabinoside treatment. Biomed Pharmacother, 37, 467, 1983. - 69. Weiss G., Wachter H., Fuchs D.: Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. Immunol. Today, 16, 495-499, 1995. - 70. Whitwam T., Haskins M. E., Henthorn P. S., Kraszevski J. N., Kleiman S. E., Seidel N. E., Bodine D. M., Puck J. M.: Retroviral Marking of Canine Bone Marrow: Long-Term High Level Expression of Human Interleukin-2 Receptor Common Gamma Chain in canine Lymphocytes. Blood, 92, 1565-1575, 1998. - 71. Zanjani E. D., Singer-Weinberg R., Nomdedeu B., Kaplan M. E., Wasserman L. R.: *In vitro* assessment of similarities between erythroid precursors of fetal sheep and patients with polycythemia vera. In *In Vitro Aspects of Erythropoiesis* eds. Murphy M. J., 118-122, 1978. - 72. Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Flake A. W.: Retention and multilineage expression of human hematopoietic stem cells in human-sheep chimeras. Stem Cells, 13, 101-111, 1995. - 73. Zanjani E. D., Flake A. W., Almeida-Porada G., Tran N., Papayannopoulou T.: Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. Blood, 94, 2515-22, 1999.

ENGLISH

SIGNIFICANCE OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN EXPERIMENTAL MODELS FOR *IN VIVO* INVESTIGATIONS OF HEMATOPOIESIS

Milica Kovačević-Filipović, Tatjana Božić, Jelka Stevanović

Numerous discoveries in medicine are results of experiments on different animal species. The most frequently used animals in hematopoiesis investigations are laboratory mice and rats, but so-called big animals, such as pigs, sheep, cats, dogs, and monkeys, evolution-wise closer to humans, have a place in experimental hematology as well. The specific problematics of a certain animal specie can lead to fundamental knowledge on certain aspects of the process of hematopoiesis and the biology of stem cells in hematopoiesis. Furthermore, comparative investigations of certain phenomena in different species help in the recognition of the general rules in the living world. In the area of preclinical investi-

gations, animal models are an inevitable step in studies of transplantation biology of stem cells in hematopoiesis, as well as in studies of biologically active molecules which have an effect on the hematopoietic system. Knowledge acquired on animal models is applied in both human and veterinary medicine.

Key words: animals, experimental models, hematopoiesis

РУССКИЙ

ЗНАЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕМАТОПОЕЗА *IN VIVO*

Милица Ковачевич-Филипович, Татьяна Божич, Елка Стеванович

До многочисленных открытий в медицине пришлось, благодаря экспериментами на различных видах животных. Чаще всего использованные животные в испытаниях процесса гематопоеза лабораторные мыши и крысы, междутем и „большие„ животные, как свиней, овец, кошек, собак и обезьян эволюционно более близких людям, имеют своё место в экспериментальной гематологии. Специфическая проблематика определённого вида животных может привести до фундаментальных знаний о отдельных аспектах процесса гематопоеза и биологии материнских клеток гематопоеза. Также, сравнительное испытание некоторых феноменов у различных видов помогает в замечании общих закономерностей в живом мире. В области деятельности предклинических испытаний животные модели необходимый шаг в изучении трансплантационной биологии материнских клеток гематопоеза, словно и изучению биологически активных молекул с эффектом ан гематопоетическую систему. Узнания, полученные на животных моделях имеют своё применение и в гуманной и в ветеринарной медицине.

Ключевые слова: животные, экспериментальные модели, гематопоез

**NAJČEŠĆA VIRUSNA OBOLJENJA TELADI U
INDUSTRIJSKOM ODGOJU***
MOST FREQUENT CALF DISEASES IN INDUSTRIAL BREEDING

S. Lazić, T. Petrović, I. Pušić, Maja Velhner**

Analiza učestalosti pojavljivanja oboljenja teladi virusne etiologije moguća je ako se ove bolesti podele u dve osnovne grupe. Jednu grupu čine oboljenja respiratornih organa, koja se ispoljavaju simptomima respiratornog sindroma, a drugu grupu predstavljaju oboljenja organa digestivnog trakta u vidu gastrointestinalnog sindroma.

U kompleksnoj etiologiji respiratornog sindroma smatra se da dominantnu ulogu imaju virusi i to, pre svega, virus IBR-a ili goveđi herpesvirus-1 (BHV-1), zatim virus parainfluence 3 (Pi-3), virus bovine virusne dijareje (BVDV), bovini respiratorni sincicijalni virus (RSV), ali i drugi virusi, kao što su adenovirusi, rinovirusi, koronavirusi, mogu da utiču na pojavljivanje respiratornog sindroma. Respiratorni sindrom je retko uzrokovan jednim virusnim agensom, već najčešće mešanim virusnim, ali i bakterijskim infekcijama. Mešane virusne infekcije često se završavaju letalnim ishodom po životinji.

Dosadašnja istraživanja etiologije gastrointestinalnog sindroma ukazuju da pored bakterija i virusi mogu da budu značajan etiološki činilac. Rotavirusi, koronavirusi, adenovirusi, parvovirusi, herpesvirusi (IBR virus), pestivirusi (BVDV) mogu da budu uzročnici gastrointestinalnog sindroma. Smatra se da u etiopatogenezi ovog sindroma virusi mogu da budu uzročnici u oko 10 posto slučajeva.

U radu je opisana etiopatogeneza oboljenja teladi virusne etiologije, na koja se najčešće nailazi u našim uslovima industrijskog načina gajenja goveda.

Ključne reči: etiopatogeneza, telad, virusi

* Rad primljen za štampu 20.10. 2003. godine

** Dr Sava Lazić, viši naučni saradnik, mr Tamaš Petrović, istraživač saradnik, Ivan Pušić, istraživač pripravnik, dr Maja Velhner, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Uvod / Introduction

Virusna oboljenja teladi predstavljaju značajan zdravstveno-ekonomski problem današnjeg, industrijskog odgoja goveda. Uzgoj većeg broja teladi na malom prostoru, često u jednom objektu, predstavlja idealan preduslov za nastanak i razvoj mnogih oboljenja virusne etiologije. Pored navedenog, u industrijskom načinu odgoja goveda, odnosno teladi, pažnja se poklanja populaciji, a malo jedinki. Ponekad se dešava da su osnovne biološke karakteristike gajenja teladi podređene tehnološkim zahtevima industrijskog načina uzgoja, što neminovno uzrokuje pojavljivanje različitih individualnih reakcija koje predstavljaju potencijalnu opasnost za nastajanje mnogih oboljenja, a posebno virusne etiologije.

Ukoliko se analizira učestalost pojavljivanja oboljenja teladi virusne etiologije može da se zaključi da dominiraju dve grupe oboljenja. Jednu grupu čine oboljenja respiratornih organa, koja se ispoljavaju simptomima respiratornog sindroma, a drugu grupu predstavljaju oboljenja organa digestivnog trakta u vidu gastrointestinalnog sindroma.

U složenoj etiologiji respiratornog sindroma smatra se da dominantnu ulogu imaju virusi i to, pre svega, virus IBR-a ili goveđi herepesvirus-1 (BHV-1), zatim virus parainfluence 3 (Pi-3), virus bovine virusne dijareje (BVDV), respiratorni sincicijalni virus (RSV), ali i drugi virusi kao što su koronavirusi, adenovirusi i rinovirusi koji mogu da utiču na pojavljivanje respiratornog sindroma [1]. Respiratorni sindrom je retko uzrokovan jednim virusnim agensom, već najčešće mešanim virusnim, ali i bakterijskim infekcijama uz značajan uticaj predisponirajućih činilaca kao što su ambijentalni ili uzgojni činioci. Mešane virusne infekcije često se završavaju letalnim ishodom. Ova pojava je uočljiva kada je životinja inficirana virusom BVD-a. Poznata je činjenica da BVDV deluje izrazito imunosupresivno na mnoge ćelije i efekte imunog sistema, pa na taj način omogućava nastanak i razvoj drugih infekcija.

Virusi mogu da uzrokuju pojavljivanje respiratornog sindroma čak u 100 posto slučajeva. Visok morbiditet je karakterističan za infekciju teladi uzrokovanu virusom IBR-a. Pored uzrokovanja respiratornog sindroma, ovaj virus se danas sve češće pominje kao uzročnik i meningo-encefalitisa kod teladi.

Dosadašnja istraživanja etiologije gastrointestinalnog sindroma ukazuju da pored bakterija i virusi mogu da budu značajan etiološki činilac. Rotavirusi, koronavirusi, adenovirusi, parvovirusi, pestivirusi (BVD), herpesvirusi (IBR virus) mogu da budu uzročnici gastrointestinalnog sindroma. Smatra se da u etiopatogenezi ovog sindroma virusi mogu da budu uzročnici u oko 10 posto slučajeva.

Cilj ovoga rada je da se, uz već postojeća saznanja, opišu i novija saznanja etiopatogeneze oboljenja teladi virusne etiologije, koja se najčešće nalaze u našim uslovima industrijskog načina gajenja goveda.

Etiološki faktori i patogeneza respiratornog sindroma /

Etiological factors and pathogenesis of respiratory syndrome

U kliničkom, kao i u ekonomskom pogledu smatra se da je od oboljenja organa za disanje najznačajnija enzootska bronhopneumonija ili respiratorni sindrom, kako se najčešće definišu razna oboljenja organa za disanje. U kliničkoj slici dominiraju simptomi koji oslikavaju akutni bronhopulmonalni sindrom. Mogu da obole telad već u uzrastu od desetak dana, kao i junad uzrasta do godinu dana. Ekonomski gubici su ogromni, jer morbiditet dostiže čak 100 posto, a mortalitet može da bude veći od 30 posto. Mnogi istraživači smatraju da respiratorni sindrom nanosi najveće štete intenzivnom načinu odgoja goveda. Yates [2] procenjuje da je respiratorni sindrom najskuplja bolest, jer pored visokog morbiditeta i mortaliteta obuhvata čitav niz drugih gubitaka i troškova kao što su smanjen prirast, slabije iskorišćavanje hrane, zaostajanje u razvoju, velika količina klaničnih konfiskata, troškovi lečenja i profilakse.

Uzroci nastanka respiratornog sindroma vrlo su složeni, a može da se kaže da nisu još uvek dovoljno izučeni. Smatra se da respiratorni sindrom nastaje kao posledica sinergističkog delovanja velikog broja činilaca koji su iz didaktičkih razloga grupisani u nekoliko grupa. Svakako da najbitniju grupu čine živi agensi, virusi i bakterije, ali im u velikoj meri potpomažu ambijentalni i uzgojni činioci. Posebno treba da se istakne da goveda, kao životinjska vrsta, svojim anatomskim i fiziološkim karakteristikama pluća predisponiraju nastanak respiratornog sindroma. Smatra se da dominantnu ulogu u nastanku respiratornog sindroma imaju virusi i to, pre svega, goveđi herpesvirus-1 (BHV-1) ili virus IBR-a, zatim virus bovine virusne dijareje (BVDV), virus parainfluence 3 (Pi-3), respiratorni sincicijalni virus, koronavirusi i drugi. Navedeni virusi se najčešće umnožavaju u epitelnim ćelijama respiratornog trakta, što uzrokuje oštećenje i propadanje ćelija i stvaranje uslova za umnožavanje prisutnih bakterija. Propadanje epitelnih ćelija respiratornog trakta kao posledica umnožavanja virusa, može da bude ekstremno brzo kada veći deo disajnih puteva ostaje bez epitela. Nakupljeni detritus, kao i veće količine sluzi uzrokuju opstrukciju sitnijih disajnih puteva i predstavljaju idealnu podlogu za umnožavanje bakterija. Posledična komplikacija ovakvog stanja su hipoksija i nekontrolisana eksudacija tečnosti u vazdušne puteve. Prema sopstvenom iskustvu, smatramo da su virusi IBR-a, Pi-3 i BVD-a najčešći primarni uzročnici respiratornog sindroma u našim uslovima odgoja teladi. Pretpostavlja se, na osnovu epizootiološke situacije, patološko-anatomske promene kod uguinulih ili kliničkih simptoma kod obolelih jedinki, da infekcije izazvane respiratornim sincicijalnim virusom, koronavirusima, kao i adenovirusima nisu značajno prisutne u govedarstvu naše zemlje. Prema tome, u narednom delu teksta opisana je geneza respiratornog sindroma uzrokovana virusima IBR-a, Pi-3 i BVD-a.

Nastanak i razvoj akutne infekcije uzrokovane IBR virusom uglavnom su poznati, dok uspostavljanje i održavanje latentne infekcije ovim virusom još predstavlja nedovoljno izučen problem. Naime, kod akutne infekcije virus se

preko površinskih glikoproteina gP i gC adsorbuje za receptore, a zatim preko glikoproteina gD, gB i gH ulazi u epitelne ćelije gornjih puteva respiratornog trakta. U citoplazmi inficiranih ćelija nastaje dezintegracija nukleokapsida virusa i virusna DNK prodire u jedro ćelije u kome se obavlja replikacija virusa. U inficiranoj ćeliji inhibiran je proces ćelijske translacije, pa ribozomi ne sintetišu ćelijske proteine, već se uključuju u sintezu virusnih proteina. Posle umnožavanja virusne DNK i sinteze proteina kapsomere nastaje njihovo udruživanje i formiranje nukleokapsida koji, prolaskom kroz membranu jedra, dobijaju omotač, a zatim egzocitozom napuštaju ćeliju. Ovaj replikativni oblik interakcije virusa i ćelija često se naziva „litični rast”, jer najčešće rezultira propadanjem ćelija. Pored akutne infekcije, kada inficirane ćelije završavaju lizom, virus IBR-a izaziva i latentnu infekciju, ali bez propadanja inficiranih ćelija. Dugo se verovalo da IBR virus izaziva latentnu infekciju samo senzornih neurona, međutim, novijim istraživanjima Winklera i sar [3] utvrđena je virusna DNK i u limfnim folikulima tonzila inficirane teladi. Novijim istraživanjima [4] utvrđeno je da kod latentne infekcije virus produkuje samo LR protein koji sa ćelijskom ciklin zavisnom kinazom 2 inhibira produkciju virusnih proteina, a time i propadanje ćelija. Prema tome, latentno inficirana životinja ne ispoljava simptome bolesti, ali ipak, povremeno, može da izlučuje virus i to od 1 000 do 100 000 virusnih čestica u mililitru eksudata [5]. Pod uticajem stresa ili upotrebom kortikosteroida u latentno inficiranim ćelijama prestaje produkcija LR proteina, a nastaje stvaranje virusnih proteina, što uzrokuje formiranje novih viriona. Reaktivacijom latentne infekcije nastaju viremija i distribucija virusa u mnoge parenhimatozne organe.

Virus Pi-3 izaziva respiratorni sindrom koji nastaje kao posledica njegovog umnožavanja u epitelnim ćelijama disajnih puteva, epitelnim ćelijama plućnih alveola i u plućnim makrofagima. Svojim umnožavanjem virus uzrokuje destukciju i propadanje ovih ćelija. Ekstremno brzo umnožavanje i brzo širenje sa ćelije na ćeliju karakteristika je ovog virusa. Destrukcijom makrofaga gubi se fagocitna sposobnost plućnog tkiva, što dodatno olakšava nastajanje sekundarne infekcije plućnog parenhima. Zapaženo je da Pi-3 virus najčešće napada ventralne delove kranijalnih i srednjih režnjeva pluća [6].

Virus BVD kod goveda izaziva akutnu i perzistentnu infekciju. Mnogi, veoma složeni mehanizmi nastanka i održavanja infekcije ovim virusom još nisu u potpunosti rasvetljeni. Poznata je činjenica da virus BVD deluje izrazito imunosupresivno, jer ima afinitet prema ćelijama imunog sistema. Tokom akutne infekcije kod teladi su zapaženi izrazita leukopenija, slabiji odgovor T-limfocita na razne mitogene, kao i smanjenje funkcije neutrofila i monocita [7]. Virus, ne samo što deluje na ćelije imunog sistema, već deluje supresivno na mnoge nespecifične mehanizme odbrane, što ima kao posledicu sistemsku cirkulaciju mnogih patogena, a posebno bakterija [8]. Mešane infekcije prouzrokovane virusom BVD sa virusima IBR-a, Pi-3, respiratornim sincicijalnim virusom ili bakterijama uzrokuju mnogo teža oboljenja nego što ovi uzročnici pojedinačno mogu da izazovu. Mešane infekcije prouzrokovane virusom BVD sa drugim virusima najčešće za-

vršavaju uginućem inficirane životinje. Ovo je posebno značajno sa aspekta etiologije respiratornog sindroma, pa zato mnogi autori ovaj virus svrstavaju u grupu uzročnika respiratornih infekcija [9, 10, 11]. Poseban značaj ovaj virus dobija ukoliko izazove infekciju fetusa od 30. pa do 120. dana gestacije, a da pri tome ne dođe do pobačaja. Tada se rađa perzistentno inficirana životinja, koja ne ispoljava kliničke simptome, a zbog posledične imunotolerancije serološki je negativna na virus BVD i tokom celog života izlučuje virus [12].

Opisani virusi imaju značajan uticaj na zdravstveno stanje teladi u našim zapatima goveda [13]. Sprovedena su preliminarna serološka ispitivanja na ove viruse u 10 zapata goveda. Metodom slučajnog izbora uzeti su uzorci krvi od 10 do 30 posto krava po jednom zapatu, a metodama mikroserum neutralizacije i testom inhibicije hemaglutinacije obavljeno je utvrđivanje specifičnih antitela za viruse IBR-a, BVD-a i Pi-3. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz preliminarnih seroloških ispitivanja virusa IBR-a, BVD-a i Pi-3 u 10 zapata goveda /

Table 1. Results of preliminary serological examinations of the viruses IBR, BVD and Pi-3 in 10 cattle herds

Zapati goveda / Cattle herd	Broj ispitanih se- ruma / Number of examined sera	Procenat seropozitivnih životinja / Percent seropositive animals		
		IBR	BVD	Pi-3
A	570	73,16	74,59	45,74
B	37	59,46	0	47,27
C	30	63,33	12	33,33
D	45	0	6,67	65,0
E	35	88,57	100	64,29
F	103	59,22	100	45,83
G	91	97,80	88,89	63,33
H	22	36,36	41,67	44
I	76	0	0	46
J	50	76	84	72

Prema prikazanim rezultatima u tabeli 1 uočava se da je u svim ispitivanim zapatima prisutna infekcija izazvana jednim ili dva virusa. Infekcija uzrokovana virusom Pi-3 prisutna je u svim ispitanim zapatima, a infekcije uzrokovane virusima IBR-a i BVD u 8 od 10 ispitanih zapata. Navedeni podaci nesumnjivo ukazuju na činjenicu da se mnoga oboljenja koja se nalaze u zapatima goveda u našoj zemlji etiološki mogu da povežu sa navedenim virusima.

Međutim, u etiogenezi respiratornog sindroma, pored mikroorganizama, značajnu ulogu imaju ambijentalni i uzgojni činioci. Temperatura sredine,

vlažnost i brzina cirkulacije vazduha, kao i prisustvo gasova smatraju se najznačajnijim ambijentalnim činiocima koji, ukoliko nisu adekvatni, značajno potpomažu pojavljivanje respiratornog sindroma. Transportovanje, prenatrpanost objekata, neujednačen uzrast životinja u grupi, neadekvatna ishrana najbitniji su uzgojni činioci i samostalno ili zajedno sa ambijentalnim činiocima značajano utiču na pojavljivanje i razvoj respiratornog sindroma. Smatra se da temperatura vazduha manja od 9 i veća od 17°C, kao i strujanje vazduha slabije od 0,2 i veće od 2 metra u sekundi predstavljaju kritične momente za odgoj teladi. Poznato je da loši ambijentalni uslovi smanjuju pritisak kiseonika u plućima, što uzrokuje hipoksiju i hipertenziju pluća. Posledično tome nastaje smanjena aktivnost cilija na sluzokoži dušnika i poremećena je fagocitna aktivnost makrofaga, što doprinosi smanjenoj evakuaciji patogenih mikroorganizama iz pluća. Konačno, nastanku respiratornog sindroma doprinose i određene anatomske-fiziološke karakteristike koje su svojstvene za goveda kao što su: veća režnjevitoost pluća nego kod ostalih životinja, mali fiziološki kapacitet izmene gasova, mala količina lizocima i mali broj makrofaga u plućima. Prema tome, respiratorni sindrom kod teladi, koliko je do sada poznato, predstavlja multikauzalno oboljenje sa značajnim uticajem velikog broja predisponirajućih faktora.

Etiološki faktori i patogeneza oboljenja organa digestivnog trakta/ *Etiological factors and pathogenesis of diseases of digestive tract organs*

Kada se govori o oboljenjima organa digestivnog trakta virusne etiologije kod teladi najčešće se misli na različite oblike gastroenteritisa ili enteritisa. Virusi koji izazivaju gastroenteritise ili enteritise replikuju se u epitelnim ćelijama sluzokože creva i u njima uzrokuju oštećenja i disfunkcije različitog nivoa. Skoro sve virusne infekcije digestivnog trakta nastaju ingestijom kontaminisane hrane i vode. Period inkubacije je veoma kratak, najčešće traje oko 12 časova, odnosno oboljenje se manifestuje brzo, bez pojavljivanja prethodnih simptoma. Međutim, virusi, da bi izazvali oboljenje, moraju da prežive kiselu sredinu želuca i bazne uslove u crevima, kao i uticaj raznih proteolitičkih enzima, soli žučnih kiselina, imunoglobulina i drugih specifičnih i nespecifičnih antivirusnih činilaca, koji su prisutni u crevima. Prema tome, nastanak i razvoj virusne infekcije creva uslovljen je, pre svega, količinom i virulencijom unetog virusa, ali i uzrastom životinje. U digestivnom traktu mladih, tek rođenih životinja, pH vrednost je neutralna, mnogi proteolitički enzimi su još neaktivni, lučenje žučnih kiselina nije još uspostavljeno, a prisustvo specifičnih ili nespecifičnih antivirusnih činilaca je isključivo uslovljeno kvalitetom i količinom uzetog kolostruma. Prema tome, digestivni trakt novorođene životinje predstavlja pogodnu sredinu za umnožavanje i kolonizaciju mnogim enteropatogenim virusima. Generalno posmatrano, može da se kaže da sve virusne infekcije počinju u proksimalnom delu duodenuma i šire se progresivno prema jejunumu i ileumu, a ponekad mogu da zahvate i deo kolona. Brzina kolo-

nizacije zavisi od količine i virulencije virusa, ali i imunog statusa životinje. Kako infekcija napreduje, epitelne ćelije propadaju i zamenjuju se mladim ćelijama kod kojih je sposobnost resorpcije i produkcije enzima znatno redukovana. Posledično ovakvom stanju u crevima se ne odvijaju potpuna digestija i resorpcija, ostaje dosta nesvarenih ili delimično svarenih hranljivih materija, što povećava osmotski pritisak i omogućava povlačenje ekstracelularne tečnosti i elektrolita u lumen creva. Posledica ovakvog stanja je pojavljivanje dijareje, kada je koncentracija suve materije u fecesu manja od 10 posto i dehidratacije [14]. Treba istaći da nastalo stanje u crevima posle virusne infekcije pogoduje umnožavanju mnogih bakterija, a pre svega *E. coli*, što prouzrokuje izraženije kliničke simptome enteritisa, a šanse za izlečenje su svedene na minimum [15]. Međutim, primećeno je da neke virusne infekcije digestivnog trakta prestaju same od sebe, verovatno zbog relativno veće rezistencije i interferencije mladih ćelija, koje brzo posle infekcije zamenjuju inficirane epitelne ćelije [16]. Naime, pretpostavlja se da se na mladim, još nezrelim epitelnim ćelijama, nisu razvili virusni receptori i da je kod njih, kao i kod ostalih ćelija, proces produkcije interferona izraženiji. Najčešći uzročnici virusnog enteritisa su rotavirusi, a ređe koronavirusi, pestivirusi (virus BVD), kao i drugi za sada neidentifikovani virusi, čija uloga u nastanku virusnih enteritisa još nije u potpunosti definisana. Prema podacima u literaturi učešće pojedinih virusa u etiologiji enteritisa je različito. Navodi se da rotavirusi izazivaju enteritis u 10 do 40 posto slučajeva, korona virusi od 5 do 10 posto, dok virus BVD u 3 do 5 posto slučajeva [14, 17, 18].

Rotavirusi, najčešće grupe A, tipični su predstavnici uzročnika virusnog enteritisa kod teladi uzrasta od svega nekoliko dana, mada su utvrđeni i u fecesu neobolele teladi uzrasta od dve do tri nedelje. Rotavirusi se veoma intenzivno umnožavaju u epitelnim ćelijama proksimalnog dela duodenuma sa izrazitom tendencijom širenja ka distalnim partijama tankih creva. Inficirana i obolela životinja izlučuje velike količine virusa, oko 10^{11} po gramu fecesa i to trećeg i četvrtog dana od početka infekcije. Rotavirusi u fecesu mogu da ostanu infektivni čak nekoliko meseci, pa objekti za držanje teladi, kao i pribor za održavanje higijene kod teladi dugo mogu da budu izvor infekcije. Neki rotavirusi su visoko rezistentni na hlor, pa u vodi za piće mogu da ostanu dugo infektivni, što treba da se ima u vidu kada se analizira transmisija virusa. Prema našim preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da rotavirusi mogu da budu uzročnici enteritisa u oko 10 posto slučajeva.

Pored rotavirusa, koronavirusi su najčešći uzročnici enteritisa kod teladi. Patogeneza korona virusa je slična kao i kod rotavirusa. Najčešće obolela telad u prvoj nedelji života. Bolest traje 4 do 5 dana, a ispoljava se izrazito žutom bojom fecesa, koji je tečan, i dehidratacijom. Koronavirusi imaju izrazit tropizam prema epitelnim ćelijama tankih creva, a samo delimično prema epitelnim ćelijama debelih creva. Enteritis izazvan koronavirusima može da se završi letalnim ishodom u 5 do 10 posto slučajeva, dok u oko 35 posto slučajeva infekcija uzrokovana koronavirusima može da protekne bez bilo kakvih komplikacija [19].

Utvrđeno je da je kod koronavirusne infekcije poremećen metabolizam glikoze i laktoze, pa se javlja hipoglikemija, laktatna acidoza i hipovolemija što može da uzrokuje akutni šok i naprasno uginuće teleta zbog prestanka rada srca. Goveđi koronavirusi mogu da budu uzročnici dijareje i kod ljudi [16].

Virus BVD se pominje kao potencijalni uzročnik enteritisa, jer napada epitelne ćelije sluzokože digestivnog trakta, kao i sluzokože ostalih organa, ali i zbog svog izrazitog imunosupresivnog delovanja, što je već objašnjeno, smatra se mogućim uzročnikom veoma teških oblika enteritisa. Enteritisi virusne etiologije mogu da predstavljaju značajan zdravstveno-ekonomski problem u prvim nekoliko nedelja života teladi. Kasnije, sa starošću, opada prijemчивost epitelних ćelija digestivnog trakta opada. Virusi mogu da budu prisutni u crevnom sadržaju, ali ne mogu da uđu u ćelije i da se u njima replikuju. Fecesom se eliminišu u spoljašnju sredinu i postaju potencijalni uzročnici virusnog enteritisa kod mlade, tek rođene teladi.

Kao što je već navedeno udružene infekcije izazvane virusima koji napadaju gornje respiratorne puteve ili gastrointestinalni trakt mogu da dovedu do nepovoljnog ishoda oboljenja praćenog visokim morbiditetom i mortalitetom, što izaziva velike ekonomske štete. Prema tome, način držanja životinja, ishrana, nega i imunoprofilaksa značajno mogu da doprinesu povoljnijem ishodu bolesti, pogotovo ako se u zapatu nađu visoko patogeni sojevi virusa. Ukoliko se obavlja analiza oboljenja teladi virusne etiologije sa aspekta veterinarske medicine tada je potrebno da se pored imunoprofilakse posebna pažnja pokloni i preventivnoj terapiji, koja je danas sastavni deo dobro organizovanog programa uzgoja u govedarskoj proizvodnji.

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije u okviru projekta BTR 4331. B

Literatura / References

1. Lazić S., Đuričić Bosiljka, Jovičin M., Došen R., Lalić M.: „11. savetovanje veterinarara Srbije”, Zlatibor, 31.8-4.9.1999. godine, Zbornik radova i kratkih sadržaja, 102-106, 1999. - 2. Yates W. D. G.: Can. J. Comp. Med. 46, 3, 225-263, 1982. - 3. Winkler M. T., Doster A., Jones C., J. Virol. 74, 11, 5337-5346, 2000. - 4. Ašanin Ružica, Milić N., Radojčić Marina, Krnjić D.: Clinica veterinaria, 78-81, 2002. - 5. Siebert S., Auer S., Heinen E., Kretzdorn D., Strube W., Tieratztl. Umschau, 9, 82-87, 1995. - 6. Quinn J. P., Markey K. B., Carter E. M., Donnelly C. J. W., Leonard C. F.: Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2002. - 7. Castrucci G., Ferrari M., Traldi V., Tartaglione E.: Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 15, 4, 261-270, 1992. - 8. Grotelueschen D. M., Mortimer R. G.: The bovine practitioner, 23, 52-55, 1998. - 9. Fulton W. R., Purdy W. C., Confer W. A., Saliki T. J., Loan W. R., Briggs E. R., Burge J. L.: Can. J. Vet. Res., 64, 151-159, 2000. - 10. Mars H. M., Bruschke M. J. C., Oirschot T. J., Vet. Microbiology, 66, 197-207, 1999. - 11. Castrucci G., Ferrari M., Traldi V., Tartaglione E.: Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 15, 4, 261-270, 1992. - 12. Brownlie J.: O. I. E. 59th General Session-Pestiviruses of Ruminants, Paris, 1991. - 13. Đuričić Bosiljka, Petrović T., Lazić S., Jermolenko Gordana,

Milošević B.: 13. savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor 11-14.9. 2001, Zbornik radova i kratkih sadržaja, 23-32, 2001. - 14. Acres S. D., Laing C. J., Saunders J. R., Radostits O. M., Can. J. Comp. Med., 39, 2, 116-132, 1975. - 15. Lazić S., Petrović T., Lupulović Diana, Gavrović M., Rogan D.: Treće savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, Budva, 11-15. juni 2001. Zbornik radova „Clinica veterinaria“, 142-147, 2001. - 16. Murphy A. F., Gibbs J. P., Horzinek C. M., Studdert J. M.: Veterinary Virology, Thrd Edition, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1999. - 17. Klingenberg K. V., Svensson K. L.: Acta Vet. Scand. 39, 2, 195-199, 1998. - 18. Lotthammer K. H., Ehlers J., Dtsch Tierarztl. Wochenschr., 97, 10, 418-420, 1990. - 19. Hasoksuz M., Microbiologia Balkanica 2003, 3rd Balkan Conference of Microbiology, Istanbul, 158-161, 2003. - 20. Lazić S., Šamanc H.: Clinica veterinaria, 238-245, 2000. - 21. Barrington G. M., Gay J. M., Evermann J. F.: Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 18, 1, 7-34, 2002. - 22. Morin M., Lariviere S., Lallier R.: Can. J. Comp. Med., 40, 3, 228-240, 1976. - 23. Saif L. J., Smith K. L.: J. Dairy Sci., 68, 1, 206-228, 1985.

ENGLISH

MOST FREQUENT CALF DISEASES IN INDUSTRIAL BREEDING

S. Lazić, T. Petrović, I. Pušić, Maja Velhner

It is possible to conduct an analysis of the incidence of viral diseases in calves if these diseases are divided into two basic groups. One group comprises diseases of respiratory organs which are manifested by symptoms of a respiratory syndrome, and the second group comprises diseases of digestive tract organs in the form of a gastrointestinal syndrome.

It is considered that viruses have the dominant role in the complex etiology of the respiratory syndrome, primarily the IBR virus or the Bovine Herpes Virus-1 (BHV-1), followed by the parainfluenza 3 virus (RSV), the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), the bovine Respiratory Syncytial Virus (RSV), but also other viruses, such as adenoviruses, rhinoviruses, coronaviruses, can also influence the appearance of the respiratory syndrome. The respiratory syndrome is rarely caused by a single viral agent, but most frequently by mixed viruses, but also by bacterial infections. Mixed viral infections often have a lethal outcome.

Investigations of the etiology of the gastrointestinal syndrome so far indicate that, in addition to bacteria, viruses can also be a significant etiological factor. Rotaviruses, coronaviruses, adenoviruses, parvoviruses, herpesviruses (the IBR virus), pestiviruses (BVDV), can be the causes of a gastrointestinal syndrome. It is believed that viruses can be the cause in about 10% cases in the etiopathogenesis of this syndrome.

The paper describes the etiopathogenesis of calf diseases of viral etiology which are most often found in the local conditions of industrial breeding of calves.

Key words: etiopathogenesis, calves, viruses

САМЫЕ ЧАСТЫЕ ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТЕЛЯТ В ПРОМЫШЛЕННОМ РАЗВЕДЕНИИ

С. Лазич, Т. Петрович, И. Пушич, Мая Велхнер

Анализ частоты появления заболеваний телят вирусной этиологии возможен если эти болезни разделяются в две основные группы. Одну группу составляют заболевания респираторных органов, манифестируемые симптомами респираторного синдрома, а вторую группу представляют собой заболевания органов пищеварительного тракта в виде гастроинтестинального синдрома.

В комплексной этиологии респираторного синдрома считается, что доминирующую роль имеют вирусы, а именно прежде всего вирус ИБР-а или говяжий герпес вирус-1 (ГГВ-1), затем вирус параинфлюэнцы 3 (Пи-3), говяжий вирус вирусной диареи (ГВВД-DVB), говяжий респираторный синциальный вирус (РСВ), но и другие вирусы, как аденовирусы, риновирусы, коронавирусы, могут иметь влияние на явление респираторного синдрома. Респираторный синдром редко бывает причиной одним вирусным агентом, уже чаще всего смешанным вирусом, но и бактериальными инфекциями. Смешанные вирусные инфекции часто заканчиваются летальным исходом.

Бывшие до сих пор исследования этиологии гастроинтестинального синдрома указывают, что возле бактерий и вирусы могут быть значительный этиологический фактор. Ротавирусы, коронавирусы, аденовирусы, парвовирусы, герпесвирусы (ИБР вирус), пестивирусы (ГВВД-BVD) могут быть возбудители гастроинтестинального синдрома. Считается, что в этиопатогенезе этого синдрома вирусы могут быть возбудители в около 10 % случаев.

В работе описан этиопатогенез заболеваний телят вирусной этиологии, которые чаще всего встречаются в наших условиях промышленного способа разведения крупного рогатого скота.

Ключевые слова: этиопатогенез, телята, вирусы

**SADRŽAJ LIPIDA I GLIKOGENA U JETRI KOD VISOKO-
PRODUKTIVNIH MLEČNIH KRAVA U PERIPARTALNOM
PERIODU***

***LIPID AND GLYCOGEN CONTENTS IN LIVER OF HIGH-YIELD DAIRY
COWS IN PERIPARTAL PERIOD***

R. Đoković, H. Šamanc**

Od krava holštajn rase u visokom graviditetu i ranoj laktaciji biopsijom su uzimani uzorci tkiva jetre za patološko-histološka ispitivanja. Sadržaj masti u hepatocitima je određivan stereometrijskom metodom izračunavanjem volumenske gustine, a glikogena semikvantitativno mikroskopskim pregledom isečaka bojenih metodom po Bestu.

Patološko-histološkim ispitivanjem uzoraka tkiva jetre kod zdravih, steonih i tek oteljenih krava nisu utvrđene masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre a hepatociti su u potpunosti ili delimično ispunjeni glikogenom.

Kod krava obolelih od ketoze patološko-histološkim ispitivanjem uzoraka tkiva jetre su utvrđena masna infiltracija i degeneracija hepatocita, različitog intenziteta. Samo kod jedne krave obolele od ketoze utvrđen je blagi stepen masne infiltracije, kod šest krava srednji stepen masne infiltracije i degeneracije, a kod tri krave težak oblik zamašćenja ćelija jetre.

Količina glikogena u hepatocitima je u negativnoj korelaciji sa stepenom masne infiltracije i degeneracije. Pri teškom stanju zamašćenja u citoplazmi hepatocita u potpunosti nedostaje glikogen.

Ključne reči: krava, peripartalni period, jetra, lipidi, glikogen

Uvod / Introduction

U ranoj laktaciji potrebe mlečne žlezde za glikozom kod mlečnih krava uvek su veće nego što ima raspoložive glikoze. Ovaj disbalans uzrokuje negativan

* Rad primljen za štampu 24. 12. 2003. godine

** Dr Radojica Đoković, docent, Agronomski fakultet, Čačak; dr Horea Šamanc, profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

energetski i ugljeno-hidratni bilans, smanjuje proces glikoneogeneze i rezerve glikogena u jetri. Telesne rezerve masti koje mogu da budu vrlo velike na početku laktacije mobilisu se u mnogo većem stepenu nego što su stvarne potrebe organizma uslovljene negativnim bilansom energije, što omogućava povećano nakupljanje masti u hepatocitima i intenziviranje ketogeneze u jetri [8, 1]. Kod mlečnih krava prisutna je hipoglikemija, a usled nakupljanja kapljica masti u hepatocitima i kao i toga da mlečna žlezda ima povećano korišćenje glikoze nastaje značajno opadanje, pa i nestanak glikogena u hepatocitima. Veenhuizen i sar [10] utvrdili su da količina glikogena u jetri značajno opada kod krava sa masnom jetrom u prvoj nedelji laktacije u odnosu na zdrave životinje, odnosno da količina glikogena opada do minimalnih vrednosti na dve nedelje pre pojavljivanja ketoze kod životinja. To potvrđuje i značajno negativna korelacija između sadržaja masti i glikogena u hepatocitima [10, 5]. Naime, usled povećanog nakupljanja masti u jetri i iscrpljivanja rezervi glikogena u hepatocitima kod krava u peripartalnom periodu, proces masne infiltracije i degeneracije hepatocita kod pojedinih krava posle teljenja uzrokuje intenziviranje procesa ketogeneze i nakupljane masti u jetri u značajnom stepenu.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Za ispitivanje su odabrane visokosteone ($n=20$) i tek oteljene krave ($n=20$) rase holštajn. Odabrane visoko steone krave su podeljene u dve grupe i to na grupu krava ($n=13$) kod kojih su se uzorci tkiva jetre uzimali u periodu od 10. do 4. dana pre teljenja i grupu krava ($n=7$) kod kojih su se uzorci tkiva jetre uzimali u periodu od 4. do 1. dana pre teljenja. Odabrane tek oteljene krave takođe su podeljene u dve grupe: grupu krava ($n=10$) koje su bile klinički zdrave i grupu krava ($n=10$) koje su pokazivale kliničke znake ketoze.

Uzorci jetre su se uzimali od svake krave metodom perkutane biopsije jetre, Gaalovom modifikovanom metodom po Hajovcava-Kacifirexu (1967). Isečci dobijeni biopsijom jetre fiksirani su u 10% neutralnom formalinu i apsolutnom alkoholu. Parafinski isečci bojeni su HE-metodom, zatim metodom za glikogen po Bestu i trihromnom metodom po Masson-Goldneru. Kriotomski isečci tkiva fiksirani su u formalinu i bojeni su Sudan -3 metodom za masti.

Sadržaj masti u hepatocitima određivan je stereometrijski, izračunavanjem volumenske gustine. Sadržaj glikogena u hepatocitima se ocenjivao semikvantitativno. U slučajevima kada je hepatocit u potpunosti ispunjen zrcima glikogena, takav nalaz je označen sa +, +, +. Smanjenje glikogena u hepatocitima za $1/3$ do $1/2$ označeno je sa +, +. Smanjenje glikogena u hepatocitima manje od $1/2$ od optimalne količine označeno je sa +. Nalaz glikogena u tragovima ili njegov potpun nedostatak u hepatocitima označen je sa –.

Rezultati ispitivanja i diskusija / *Results and discussion*

Rezultati patohistološkog ispitivanja isečaka jetre ukazuju da kod zdravih steonih i tek oteljenih krava nisu zapažene masna infiltracija i degeneracija hepatocita (<10% masti). Kod krava obolelih od ketoze utvrđeno je zamašćenje jetre različitog stepena.

Rezultati ispitivanja sadržaja masti u jetri krava obolelih od ketoze prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Sadržaj masti u jetri krava obolelih od ketoze ($\mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^3$, %) /
Table 1. Lipid content in liver of ketotic cows ($\mu\text{m}^3/100 \text{mm}^3$, %)

Redni broj / Cow number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
% masti u jetri / % lipids in liver	25.44	23.66	23.98	61.15	44.82	42.56	16.04	31.86	32.98	26.62	32.91

Na osnovu sadržaja masti u jetri koji je utvrđen kod krava obolelih od ketoze sve ispitivane krave mogu da se svrstaju prema predlogu Gaala [2] u tri grupe:

1. grupa – krave sa blagim stepenom zamašćenja jetre (od 0 do 20 % masti),
2. grupa – krave sa srednjim stepenom zamašćenja jetre (od 20 do 40 % masti),
3. grupa – krave sa teškim stepenom zamašćenja jetre (više od 40 % masti)

Iz dobijenih rezultata može da se vidi da je samo kod jedne krave obolele od ketoze utvrđen blagi stepen masne infiltracije ćelija jetre ili 10 posto ispitivanih krava, zatim kod 6 krava srednji stepen masne infiltracije i degeneracije ćelija jetre ili 60 posto ispitivanih krava, a kod tri krave obolele od ketoze (30% krava) utvrđen je težak stepen zamašćenja ćelija jetre.

Schafer i sar [6] u svom radu su utvrdili nešto niže vrednosti, odnosno kod 65,4 posto ketoznih krava utvrđen je blagi, zatim kod 25,3 posto srednji stepen, a samo kod 9,3 posto težak stepen zamašćenja jetre. Slične rezultate su ustanovili Gerloff i sar [3], koji su kod 63,5 posto krava utvrdili blagi stepen, a kod 36,5 posto srednji i teški stepen masne jetre.

Količina glikogena u jetri procenjivala se semikvantativno mikroskopskim pregledom isečaka jetre bojenih metodom po Bestu.

Rezultati ispitivanja količine glikogena u jetri prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj glikogena u jetri kod zdravih krava u visokom graviditetu i puerperijumu i krava obolelih od ketoze
Table 2. Glycogen content in liver of healthy cows in advanced gravidity and peripartal period and ketotic cow

Redni broj krave / Cow number		n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Visoki graviditet / Advanced gravidity	10-5 dana a. p. * / 10-15 days a.p. *	13	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	4-1 dana a. p. * / 4-1 days a. p. *	7	+++	+++	++	++	++	++	++						
Puerperijum / Peripartal period	zdrave krave / healthy cows	10	++	+	+	+	++	+	++	+	+	++			
	ketozne krave / ketotic cows	10	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-			

*a. p. = ante partus / a.p. ante partus

Kod životinja koje su bile zdrave glikogen je u potpunosti ispunjavao hepatocite i jasno se uočava u vidu zrnaca – granula crvene boje, ravnomerno raspoređenih u citoplazmi (+, +, +).

Ovakav nalaz je utvrđen kod 10 zdravih krava u periodu od 10 do 5 dana pre teljenja ili kod 77 posto ispitivanih krava, dok su kod tri zdrave životinje (23% krava) utvrđene nešto manje količine glikogena u hepatocitima (+, +).

Kod grupe krava neposredno pre teljenja (4-1. dana a. p.), utvrđena je kod 43 posto životinja (tri krave) potpuna ispunjenost hepatocita glikogenom (+, +, +), dok je kod 57 posto životinja (četiri krave) utvrđena smanjena količina granula glikogena u hepatocitima za 1/3 do 1/2 (+, +). Kod zdravih krava posle teljenja kod 40 posto ispitivanih krava (četiri krave), utvrđene su smanjene količine glikogena u hepatocitima (+, +), a kod 60 posto krava (šest krava) utvrđeno je smanjivanje glikogena u hepatocitima ispod optimalnog sadržaja (+).

Kod krava koje su posle teljenja obolele od ketoze, kod 80 posto ispitivanih životinja (osam krava) utvrđen je potpun nedostatak glikogena u hepatocitima ili nalaz glikogena u tragovima (-), dok je samo kod dve ispitivane životinje (20% krava) utvrđeno postojanje glikogena u malim količinama (+).

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su ukazali da su rezerve glikogena u jetri male kod krava sa blagim i srednjim stepenom zamašćenja jetre, a kod krava sa teškim stepenom masne jetre rezerve glikogena su u potpunosti ispražnjene [4, 5, 7].

Na osnovu naših rezultata i rezultata drugih autora može da se konstatuje da kod mlečnih krava obolelih od ketoze na početku laktacije, nastaje značajno smanjivanje, pa i nestajanje glikogena u hepatocitima, a da se u isto vreme značajno povećavaju broj i količina masnih kapljica [6, 1].

Zaključak / Conclusion

1. Patološko-histološkim ispitivanjem uzoraka tkiva jetre kod zdravih steonih i tek oteljenih krava nisu utvrđene masna infiltracija i degeneracija ćelija jetre, a hepatociti su u potpunosti ili delimično ispunjeni glikogenom.

2. Kod krava obolelih od ketoze patološko-histološkim ispitivanjima uzoraka tkiva jetre utvrđene su masna infiltracija i degeneracija hepatocita različitog stepena.

3. Količina glikogena u hepatocitima je u negativnoj korelaciji sa stepenom masne infiltracije i degeneracije. Pri teškom stepenu zamašćenja jetre u citoplazmi hepatocita u potpunosti nedostaje glikogen.

Literatura / References

1. Forenbacher S.: Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja, svezak 2, jetra. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 1993. - 2. Gaal T.: Sindrom masne jetre u mlečnih krava. Vet. glasnik, 47, 4-5, 311-317, 1993. - 3. Gerloff B., Herdt T., Emery R.: Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cat-

tle.JAVMA 188, 8, 845-949, 1986. - 4. Reid I. M.: Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. Veterinary Record 107, 281-288. - 5. Johannsen U., Solveig Manger., Staufenberg R., Klukas H.: Untersuchungen zur morphologie und funktion der leber von hochleistungskuhern 2, Wochen postpartum. Dtsch. Tierarzti. Wschr. 100, 168-208, 1993. - 6. Schafer M., Furl M., Johansen U., Ehrentant W., Decret W.: Verhalten klinisch chemischer kennwerte des blutes von milchkuhen in abhangigkeit von fettgehalt der leber. Mh. Vet. Med. 46, 666-669, 1991. - 7. Staufenberg R., Meier R., Hachbart K. H., Staufenberg Beate: Untersuchungen zum optimierten fettansatz bei der Milchkuh. Mh. Vet. Med. 47, 125-136, 1992. - 8. Staufenberg R., Staufenberg Beate., Rossow Weidemann F.: Energie- und fettstoffwechsel des Rindes. Vergleich der Aussage der Rucken fett dicke mit anderen Untersuchungszahlen. Mh. Vet. Med. 48, 167-174, 1993. - 9. Vazquez-Anon M., Bertics S., Luck M., Grummer R.: Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. J. Dairy Sci. 77, 1521-1528, 1994. - 10. Veenhuizen J. J., Drackley J. K., Richard M. J., Sanderson T. P., Miller L. D., Joung J. W.: Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of Experimental Fatty liver and ketosis in cows. J. Dairy Sci. 74, 4238-4253, 1991.

ENGLISH

LIPID AND GLYCOGEN CONTENTS IN LIVER OF HIGH-YIELD DAIRY COWS IN PERIPARTAL PERIOD

R. Đoković, H. Šamanc

Liver tissue samples were taken by biopsy from Holstein cows in advanced stages of gravidity and in early lactation for pathological-histological examinations. Lipid content in hepatocytes was determined using the stereometric method by calculating volume density, and of glycogen using semi-quantitative microscopic examination of sections stained according to the method of Best.

Pathological-histological examinations of liver tissue samples in healthy animals, gravid or periparturient cows did not reveal lipid infiltration or cell degeneration, and hepatocytes were completely or partly filled with glycogen.

In ketotic cows, pathological-histological examinations of liver tissue samples showed lipid infiltration and hepatocyte degeneration of different intensity. In only one ketotic cow, we determined a slight degree of lipid infiltration, there was a medium degree of lipid infiltration and degeneration in six cows, and three cows were found to have a grave form of fatty liver.

The quantity of glycogen in hepatocytes is in negative correlation with the degree of lipid infiltration and degeneration. In severe cases of fatty liver, glycogen is completely absent from hepatocyte cytoplasm.

Key words: Cow, periparturient period, liver, lipids, glycogen.

СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ И ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ ВЫСОКО-ПРОДУКТИВНЫХ МОЛОЧНЫХ КОРОВ В ПЕРИПАРТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Р. Джокович, Х. Шаманц

Из коров холштайн породы в высокой беременности и ранней лактации биопсией браны образчики тканей печени для патолого-гистологических испытаний. Содержание жира в гепатоцитах определяли стереометрическим методом высчитыванием объёмной густоты, а гликогена семиколличественно микроскопическим осмотром высечков, крашенных по Бесту.

Патолого-гистологическим испытанием образчиков тканей у здоровых, стельных и лишь отеленных коров не утверждены полностью или частично исполнены гликогеном.

У коров, заболевших кетозом патолого-гистологическим испытанием образчиков тканей печени утверждена жирная инфильтрация и дегенерация гепатоцитов, различной интенсивности. Только у одной коровы, заболевшей кетозом утверждена мягкая степень жирной инфильтрации, у шести коров средняя степень жирной инфильтрации и дегенерации, а у трёх коров тяжёлая форма зажирения клеток печени.

Количество гликогена в гепатоцитах в отрицательной корреляции со степенью жирной инфильтрации и дегенерации. При тяжёлом состоянии зажирения в цитоплазме гепатоцитов полностью недостает гликоген.

Ключевые слова: корова, перипартальный период, печень, липиды, гликоген

**UTICAJ RAZNIH ČINILACA NA INFEKCIJE MLEČNE
ŽLEZDE UZROKOVANE BAKTERIJAMA VRSTE
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS****

***EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON MAMMARY GLAND
INFECTION WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS BACTERIA***

A. Jurčević, A. Pengov**

Cilj našeg istraživačkog rada je bio da utvrdimo na koji način određeni činioci (okolina, lečenje, preventiva i životinja) utiču na infekciju vimena izazvanu bakterijom Staphylococcus aureus (S. aureus).

Anketom smo proučili uticaj raznih činilaca na učestalost pojavljivanja infekcije uzrokovane bakterijom S. aureus. Utvrdili smo da su preventiva, lečenje na osnovu rezultata bakterioloških ispitivanja i antibiograma i eliminisanje negativnih uticaja okoline osnova za smanjenje učestalosti pojavljivanja oboljenja vimena.

Rezultate ankete smo proverili metodom analize varijanse i utvrdili da uticaj okoline signifikantno odstupa od drugih činilaca (preventiva, lečenje i dijagnoza, životinja). Naši rezultati ukazuju da odgajivač, uz dobru preventivu i dobro lečenje mastitisa, često zaboravlja na staju, odnosno na okolinu u kojoj se zadržavaju krave. Loši uslovi u staji negativno utiču na otpornost krava i istovremeno omogućavaju postojanje i razmnožavanje patogenih vrsta bakterija. Pored loših uslova u stajama, ne sme da se zaboravi ni preventiva i terapija upale mlečne žlezde. Na osnovu naših prethodnih istraživanja (Pengov i saradnici, 2000), za terapiju upale mlečne žlezde preporučujemo da se koristi kombinacija amoksicilina i klavulonske kiseline, a kao preventiva upale mlečne žlezde da se upotrebi mast za vime.

Ključne reči: mastitis, Staphylococcus aureus

* Rad primljen za štampu 20.10. 2003. godine

** Dr vet. med. Alen Jurčević, „Lek” d.d., Ljubljana, Slovenija; dr vet. med. Andrej Pengov, profesor, Institut za mikrobiologiju i parazitologiju, Veterinarski fakultet, Ljubljana, Slovenija

Uvod / Introduction

Izrazom mastitis označava se upala mlečne žlezde. Mastitis se sporadično pojavljuje kod svih vrsta sisara, a sa zdravstvenog i privrednog aspekta ova bolest je posebno značajna kod krava, ovaca i koza. Prve zapise o upali mlečne žlezde kod životinja nalazimo u srednjem veku. Povećanjem broja životinja i stalnim povećanjem mlečnosti povećavali su se i problemi koji su se odnosili na mastitis tako da smo danas svedoci prave „poplave” članaka iz svih krajeva sveta koji obrađuju ovu problematiku [1].

I pored mnogobrojnih istraživanja, izrade preventivnih programa i široke primene antibiotika u lečenju, upala mlečne žlezde je još uvek najozbiljniji i vrlo skup problem u intenzivnoj proizvodnji mleka. Posle prividnih uspeha iz šezdesetih i sedamdesetih godina, ograničene mogućnosti upotrebe antibiotika jasno su se pokazale upravo kod mastitisa. Naravno, antibiotici i hemoterapeutici će biti neophodni i ubuduće, naročito kod akutnih upala vimena, ali uprkos tome stručnjaci tragaju za novim i efikasnijim putevima, naročito u preventivi oboljenja vimena [2].

Cilj ovog istraživanja je bio da se pomoću ankete, posmatranja, kliničkih pregleda i laboratorijskih ispitivanja odredi uticaj pojedinih činilaca (okolina, lečenje, preventiva i otpornost životinje) na stepen zaraženosti stada bakterijom *S. aureus*.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Podatke za naše istraživanje prikupili smo sa 18 seoskih imanja u raznim delovima Slovenije. Pri izboru imanja uzimali smo u obzir spremnost odgajivača da učestvuje u istraživanju. Radi bolje preglednosti i lakše obrade podataka imanja smo označili brojevima od 1 do 18. Izabrali smo veća stada sa intenzivnom proizvodnjom, kao i manja stada kod kojih je način privređivanja više ekstenzivan. Na velikim imanjima u proseku je bilo 38, a na manjim 10 krava muzara. Krave su uglavnom bile crno-bele pasmine, a nešto je bilo i svetlolisastih, odnosno ukrštenih između svetlolisaste i crno-bele pasmine.

Na pomenutim imanjima pregledali smo 350 krava i uzeli 1282 uzorka mleka iz pojedinih četvrti vimena.

Uzorke mleka smo uzimali tako što smo najpre obrisali sise suvim papirnim ubrusom, a zatim dezinfikovali vrhove sise vatom namočenom 70%-tnim etil-alkoholom. Mleko smo izmuzli u sterilne epruvete od 10 ml koje smo stavili u rashladnu torbu i odvezli u laboratoriju.

Rezultati rada / Results

Činioci koji utiču na stepen zaraženosti krava bakterijom *S. aureus*

Pomoću ankete i posmatranjem želeli smo da utvrdimo kako pojedini činioci utiču na zaraženost krava bakterijom *S. aureus*. Proučavali smo uticaj činilaca kao što su:

- preventiva,
- lečenje i dijagnoza oboljenja vimena,
- okolina,
- životinja.

Želeli smo da utvrdimo da li neki od navedenih činilaca odstupa od ostalih u pogledu infekcije mlečne žlezde uzrokovane bakterijom *S. aureus*.

Svaki od tih činilaca ocenili smo različito:

- preventiva, 35 poena;
- lečenje i dijagnoza, 30 poena;
- okolina, 20 poena;
- životinja, 15 poena (svaku kravu u staji pojedinačno smo ocenili, a zatim izračunali prosečan broj poena svih krava u staji).

Tabela 1. Pregled raspodele poena po pojedinim stajama dobijene obradom ankete /
Table 1. Distribution of factor points in barns according to the questionnaire

	Preventiva / Prevention		Lečenje i dijagnoza / Treatment and diagnosis		Okolina / Environment		Krave / Cows		Zaraže- nost / Infection
	p	%	p	%	p	%	p	%	%
Staja 1 / Barn 1	31,5	90	30	100	8,5	42,5	7,2	48	12,5
Staja 2 / Barn 2	33	94,2	23	76,6	14,5	72,5	7,3	48,6	8,9
Staja 3 / Barn 3	1	2,8	17	65,6	2,5	12,5	3,2	21,3	57,5
Staja 4 / Barn 4	23	65,7	30	100	5,75	28,7	6,3	42	0
Staja 5 / Barn 5	22,5	64,3	14,5	48,3	2	10	6,2	41,3	2,9
Staja 6 / Barn 6	22	62,8	30	100	1	5	4,2	32,6	40
Staja 7 / Barn 7	27,5	50	30	100	6,25	31,2	4,4	22	4,2
Staja 8 / Barn 8	19	55,7	20	66,6	11	55	9,3	62	6,3

nastavak tabele 1. / <i>engleski</i>									
	Preventiva / <i>Prevention</i>		Lečenje i dijagnoza / <i>Treatment and diagnosis</i>		Okolina / <i>Environment</i>		Krave / <i>Cows</i>		Zaraže- nost / <i>Infection</i>
	p	%	p	%	p	%	p	%	%
Staja 9 / <i>Barn 9</i>	30,5	87,1	15,5	51,6	8,25	41,2	3,2	21,3	10
Staja 10 / <i>Barn 10</i>	29,5	84,3	20	66,6	19	95	4,7	31,3	5,3
Staja 11 / <i>Barn 11</i>	16,5	47,1	30	100	6,5	32,5	2,3	15,3	12,5
Staja 12 / <i>Barn 12</i>	8,5	24,2	24,5	81,6	7	35	4,1	27,3	8,3
Staja 13 / <i>Barn 13</i>	17,5	50	24,5	81,6	6	30	5,3	36,6	4,2
Staja 14 / <i>Barn 14</i>	13	37,1	25,5	85	11	55	4,5	30	26,7
Staja 15 / <i>Barn 15</i>	20,5	58,6	30	100	4	20	4,3	28,6	3,8
Staja 16 / <i>Barn 16</i>	18,5	52,9	30	100	15,8	78,7	4,4	29,3	5,1
Staja 17 / <i>Barn 17</i>	30,5	87,1	25,5	85	18	90	4,3	28,7	13,3
Staja 18 / <i>Barn 18</i>	15,5	42,8	30	100	7	35	4,7	31,3	27,1

p – poeni / *p – points*; % – udeo / *% – percent participation*

Statistička obrada ankete i zapažanja / *Statistical analyses of the questionnaire*

Pomoću statističkog programa SPSS (anova – analiza varijanse – sa jednim ulazom) upoređivali smo međusobni uticaj pojedinih činilaca na zaraženost četvrti vimena bakterijom *S. aureus*.

Tabela 2. Prikaz statističke obrade anketnog upitnika pomoću analize varijanse /
Table 2. Statistical analyses of the questionnaire with anova

ANOVA – Analiza varijanse / ANOVA – Variant analysis

		Zbir kvadrata / Sum of squares	Stepeni slobode / Degrees of freedom	Glavni kvadrat / Main square	Funkcija faktora analize / Analysis factor function	Signifikacija / Significance
Prevent / Preventive	Varijansa između uzoraka / Variant between samples	8996,604	14	642,615	1,397	,494
	Varijansa unutar uzoraka / Variant within samples	920,205	2	460,102		
	Ukupna varijansa / Total variant	9916,809	16			
Lečenje i dijagnoza / Treatment and diagnosis	Varijansa između uzoraka / Variant between samples	4936,962	14	352,640	4,166	,210
	Varijansa unutar uzoraka / Variant within samples	169,280	2	84,640		
	Ukupna varijansa / Total variant	5106,242	16			
Okolina / Environment	Varijansa između uzoraka / Variant between samples	11831,249	14	845,089	33,324	,030*
	Varijansa unutar uzoraka / Variant within samples	50,720	2	25,360		
	Ukupna varijansa / Total variant	11881,969	16			
Krava / Cow	Varijansa između uzoraka / Variant between samples	1555,246	14	111,089	,346	,911
	Varijansa unutar uzoraka / Variant within samples	641,225	2	320,613		
	Ukupna varijansa / Total variant	2196,471	16			

*najveći uticaj / biggest influence

Diskusija / Discussion

Pomoću ankete i posmatranjem proučavali smo uticaj pojedinih činilaca na stepen zaraženosti četvrti vimena uzrokovane bakterijom *S. aureus*. U izboru činilaca bile su nam od pomoći već poznate činjenice o širenju bakterije *S. aureus*, načinu ulaska u mlečnu žlezdu, patogenezi i načinu lečenja mastitisa izazvanog ovom vrstom bakterija.

Činioce smo svrstali u četiri sklopa:

- preventiva,
- lečenje i dijagnoza,
- okolina,
- životinja.

Za sprečavanje širenja prouzrokovala kao što je *S. aureus* preduzimaju se razne mere. U našem anketnom upitniku uzeli smo u obzir samo one najvažnije. Takva mera je, na primer, održavanje čistoće sisa i vimena između dve muže. Pri tom, važnu ulogu ima čišćenje vimena pre muže. Upotrebom papirnog ubrusa za jednokratnu upotrebu smanjuje se mogućnost prenošenja prouzrokovala sa zaraženih krava na zdrave. Kod preventive infekcija izazvanih stafilokokama važna je, takođe, i dezinfekcija sisa posle muže, zato što se time smanjuje mogućnost ulaska bakterije *S. aureus* u vime. Prema podacima iz literature, mišić za zatvaranje kanala sise na distalnom delu posle muže ostaje otvoren još 20 do 30 minuta, što je dovoljno da mikrobi sa kože sise uđu u mlečnu žlezdu [4].

Kod preventive, u poslednje vreme se primenjuje metoda prirodnog lečenja. Na tržištu se nudi više preparata koji deluju antipiretički, antiseptički i dekongestivno. Jedan od njih je Lekaseptal®.

U anketnom upitniku smo spojili dijagnostiku oboljenja vimena i lečenje. Redovnim praćenjem broja somatskih ćelija u zbirnom uzorku mleka (za celu staju) i kod pojedinih krava na osnovu povećanog broja ćelija može da se posumnja na supklinički oblik mastitisa. Karakteristično je da kod mastitisa koji izaziva bakterija *S. aureus* čak 42 do 78 posto kliničkih oblika mastitisa prelazi u supklinički oblik što predstavlja izvor novih infekcija u stadu [5].

Ranim otkrivanjem i lečenjem supkliničkih oblika mastitisa sprečava se pojavljivanje njegovih hroničnih oblika i dalje širenje prouzrokovala. Lošem uspehu lečenja infekcija vimena izazvanih bakterijom *S. aureus* u velikoj meri doprinosi suviše kratko vreme terapije. U našoj studiji nismo uzeli u obzir vreme lečenja, ali smo uzeli u obzir ko je obavljao lečenje. Kod intramamarnih aplikacija antibiotika odgajivač često ne poštuje opštevažeća uputstva za aplikaciju te vrste lekova. Pri tom, pojavljuje se problem infekcije mlečne žlezde izazvane gljivicama kvasca. Vlasnici koji prema uputstvu veterinara sami leče mastitis često, već kod prvog poboljšanja, prekidaju terapiju i tako izazivaju pojavljivanje hroničnih infekcija i rezistenciju bakterija na pojedine antibiotike. Uglavnom važi da je parenteralna terapija sama, ili u kombinaciji sa intramamarnom, efikasnija nego sama intramamarna terapija. Prema podacima antibiograma iz prethodnih studija [3], vrlo uspešna terapija upale mlečne žlezde izazvane bakterijom *S. aureus* predstavlja kombinaciju amoksicilina i klavulonske kiseline.

U važnije činioce okoline koji utiču na pojavljivanje upale vimena svrstali smo postupak muže, pravilan rad mašine za mužu, način ishrane, prostirku u staji, klimatske uslove i opštu negu i brigu oko životinja [6]. Pitanja u anketi odnosila su se na način ishrane, prostirku, klimatske uslove i postupak muže. Negu i ishranu životinja svrstali smo u sklop koji se odnosi na otpornost krava. Povrede vimena i sisa nastale zbog suviše kratkog boksiranja za stajanje, nedovoljne količine prostirke i rešetkastog poda povećavaju rizik pojavljivanja mastitisa. Nepovoljna mikroklima u staji, pre svega, povećana vlažnost i visoka temperatura, uz lošu ventilaciju u letnjim mesecima, stvara povoljne uslove za pojavljivanje i razmnožavanje mikroorganizama koji izazivaju mastitis. Muža je najvažniji činilac

koji utiče na nastajanje mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus*. U poređenju sa sisanjem teleta, i ručna i mašinska muža neuporedivo više opterećuju tkivo vimena. Naročito je mašinska muža vrlo često „kriva” za pojavljivanje mastitisa. Najčešće opisani nedostaci mašinske muže su nepravilne vrednosti potpritiska, suviše ubrzano ili usporeno pulsiranje, muža nepripremljenog vimena, muža u prazno, začepljeni mlekovodi i dotrajalost materijala. Sistemi koji izvode regulaciju vrednosti potpritiska u skladu sa dotokom mleka i automatski skidaju sisaljke umanjuju negativne učinke mašine na tkivo vimena za vreme muže i smanjuju rizik da nastane upala. Mleko, sredstva za dezinfekciju i ultraljubičasto svetlo oštećuju površine gumenih delova mašine, one postaju hrapave, na njima se u većem broju zadržavaju patogene i saprofitne bakterije i zato je važno da se ti delovi redovno zamenjuju.

Morfološke osobine vimena kao što su:

- oblik vimena,
- dužina sisa,
- oblik sisine papile,
- udaljenost od tla,

takođe utiču na mogućnost nastajanja infekcije.

U anketnom upitniku smo ocenjivali oblik vimena, sisa i sisine papile.

Rizik nastajanja infekcije vimena raste sa starošću krava muzara, što se povezuje sa manjom sintezom gamaglobulina i morfološkim osobinama ostarelog vimena.

Statističkom obradom podataka iz anketnog upitnika utvrdili smo da svi navedeni činioci utiču na učestalost pojavljivanja infekcije mlečne žlezde izazvane bakterijom *S. aureus*. Na osnovu signifikacije može da se tvrdi sa 5% rizika ($P < 0,05$) da preventiva relativno malo utiče na infekciju izazvanu bakterijom *S. aureus*. Takođe, na osnovu F funkcije može da se oceni povezanost lečenja i dijagnoze sa infekcijom izazvanom bakterijama *S. aureus*. F funkcija, u ovom slučaju, iznosi 4,166, što znači da lečenje i dijagnoza smanjuju rizik nastajanja infekcije izazvane bakterijom *S. aureus*. Ovo može da se tvrdi sa 5% rizika ($P < 0,05$). Povezanost ovog činioca sa infekcijom izazvanom bakterijama *S. aureus* je veća od uticaja činioca preventiva. Od svih obrađenih činilaca statistički najviše odstupa okolina. F funkcija kod okoline dostiže vrednost od 33,324, što ukazuje na veliki uticaj okoline na inficiranje bakterijama *S. aureus*. U ovom slučaju, signifikacija je skoro jednaka 0, što znači da može da se tvrdi sa skoro 1% rizika ($P < 0,01$) da okolina najviše utiče na inficiranje bakterijama *S. aureus*. Na osnovu izračunate F funkcije i signifikacije može da se potvrdi uz 5% rizika ($P < 0,05$) da najmanji uticaj na inficiranje bakterijama *S. aureus* ima činilac životinja.

Odgajivači posvećuju premalo pažnje okolini u kojoj se nalaze krave. Izgleda da se ukupan uticaj okoline kao činioca koji doprinosi većem inficiranju krava bakterijama *S. aureus* može da se sagleda kada je preventiva u stadiu odgovarajuća i lečenje mastitisa adekvatno. Drugo objašnjenje, koje je verovatnije, odnosi se na problem koji se krije u sastavu anketnog upitnika. Našom anke-

tom i posmatranjem obuhvatili smo samo egzemplarni uzorak kod koga su podaci indikativni, što znači da ne važe za celu teritoriju Slovenije, već samo za staje obuhvaćene našim istraživanjem. Anketom i posmatranjem smo utvrdili da činioci koji utiču na predispoziciju životinje na mastitis (oblik sise, sisine papile, oblik vimena, čistoća vimena i sise, starost, mlečnost i kondicija) imaju najmanji uticaj na stepen zaraženosti bakterijom *S. aureus*. Činioci koje smo svrstali u sklop preventiva i lečenje i sklop dijagnostika u približno istoj meri utiču na infekciju vimena izazvanu bakterijom *S. aureus*. Naravno, ovde mora da se uzme u obzir da su svi činioci međusobno povezani.

Daljim istraživanjem bi morao da se obuhvati veći broj uzoraka (staja) iz raznih delova Slovenije. Pri tom, trebalo bi da se uspostavi veza sa veterinarima koji rade na terenu i da im se daju uzorci anketnog upitnika koje bi oni dalje distribuirali odgajivačima krava. Ovi upitnici bi se kasnije statistički obradili, a dobijeni rezultat bi dao jasniju sliku o uticaju pojedinih činilaca koji utiču na pojavljivanje mastitisa.

Literatura / References

1. Jurca J.: Mastitisi pri kravah, ugotavljanje, zatiranje in preprečevanje. Ljubljana: Kmečki glas, 84-89, 1983. - 2. Levy S. B.: Antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle. New York: Plenum Publishing Corporation, 223-248, 1992. - 3. Pengov A., Čeru S., Jurčević A.: Vpliv posameznih dejavnikov na uspeh zdravljenja vimenskih okužb (mastitisa) pri kravah ki jih povzroča *Staphylococcus aureus*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 20-22. (študentska raziskovalna naloga), 2000. - 4. Blowey R., Edmondson P.: Mastitis control in dairy herds. Ipswich: Farming Press Books, 5-17, 1995. - 5. Pearson J. K. L., Mackie P.: Factor associated with occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. Vet Rec 105, 17, 456-463, 1979. - 6. Zadnik T., Klopčič M., Pengov A.: Mlečno profilni test: rezultati dvoletnih opazovanj. In: 1. Slovenski mednarodni kongres - Mleko in mlečni izdelki. Portorož, 17, 1995.

ENGLISH

EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON MAMMARY GLAND INFECTION WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERIA

A. Jurčević, A. Pengov

The objective of our investigation was to determine how certain factors (the environment, treatment, prevention, animal) affect udder infection with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacteria.

A questionnaire investigated the effect of different factors on the frequency of infection with *S. aureus* bacteria. We established that prevention, treatment on the basis of results of bacteriological examinations and antibiograms, and the elimination of the negative influence of the environment, form a basis for reducing the frequency of udder infections.

We verified the questionnaire results with the variant analysis method and established that the effect of the environment significantly digresses from the other factors (prevention, treatment and diagnosis, animal). Our results show that the breeder, with good prevention and good treatment of mastitis, often disregards the effects of the barn and the environment in which the cows are maintained. Poor barn conditions have a negative effect on cow resistance and at the same time enable the existence and multiplication of pathogenic species of bacteria. In addition to the maintenance conditions, one must not forget prevention and therapy of mammary gland inflammation, either. On the grounds of our previous investigations (Pengov et al., 2000), we recommend for the therapy of mammary gland inflammation the use of a combination of amoxicillin and clavulonic acid, and as prevention of mammary gland inflammation the use of an udder ointment.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ДЕЯТЕЛЕЙ НА ИНФЕКЦИИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БАКТЕРИЯМИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

А. Юрчевич, А. Пенгов

Цель нашей исследовательской работы была утвердить которым способом определённые деятели (окрестность, лечение, превентива, животное) влияют на инфекцию вымени бактерией *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Анкетой мы изучили влияние разных деятелей на частоту инфекции бактерией *S. aureus*. Мы утвердили, что превентива, лечение на основе результатов бактериологических испытаний и антибиограммы и элиминации отрицательных влияний окрестности основа для уменьшения частоты заболевания вымени.

Результаты анкеты мы проверили методом анализа вариантов и мы утвердили, что влияние окрестности сигнификантно отстает от других деятелей (превентива, лечение и диагноз, животное). Наши результаты показывают, что человек, разводящий животных, при хорошей превентиве и хорошем лечении мастита, часто забывает на хлев то есть на окрестность в которой задерживаются коровы. Плохие условия в хлеве отрицательно влияют на сопротивляемость коров и одновременно делают возможным существование и размножение патогенных видов бактерий. Наряду с плохими условиями в хлевах, нельзя забыть ни превентиву и терапию воспаления молочной железы. На основе наших предыдущих исследований (Пенгов и сотрудники, 2000), для терапии воспаления молочной железы мы рекомендуем пользоваться комбинацию амоксициллина и клавулонной кислоты, а как превентива воспаления молочной железы употребить мазь для вымени.

Ключевые слова: мастит, *Staphylococcus aureus*

**REZIDUE OKSITETRACIKLINA U MLEKU KRAVA POSLE
INTRAUTERINE APLIKACIJE***
*OXITETRACYCLINE RESIDUE IN COW MILK AFTER INTRAUTERINE
APPLICATION*

V. Vuković, Nada Dugalić-Vrndić**

U ovom radu je ispitano izlučivanje rezidua oksitetraciklina mlekom krava istočno-frizijske rase koje su jednokratno intrauterino tretirane. Pri tome, ukupno 10 krava podeljeno je u dve jednake ogledne grupe, od kojih su krave jedne grupe dobile dozu od 0,5 g/kravi, a krave druge grupe primile su dozu oksitetraciklina od 1 g/kravi. Ispitivanje prisustva rezidua oksitetraciklina u mleku obavljeno je metodom Rezazurin testa sa Str. thermophilus-om, kao test mikroorganizmom. Posle i.u. doze oksitetraciklina od 0,5 g/kravi, prosečno vreme izlučivanja rezidua mlekom tretiranih krava je 46,0 (od 34 do 58) časova, pri čemu je koncentracija rezidua oksitetraciklina bila od 0,1 do 1,4 mcg/ml mleka, a posle doze od 1 g/kravi, to vreme iznosi 55,6 (34 do 82) časova, pri čemu se koncentracija rezidua oksitetraciklina kretala od 0,1 do 2,2 mcg/ml mleka.

Ključne reči: mleko, krave, rezidue, intrauterina aplikacija

Uvod / Introduction

Rezidue antibiotika dospevaju u mleko, najčešće, posle terapije raznih oboljenja muznih krava. Zapaljenje uterusa, uz mastitise, jedno je od najrasprostranjenijih oboljenja muznih krava, koje podrazumeva antibiotsku terapiju [9, 10, 12], preparate na bazi ekstrakata lekovitog bilja i propolisa [14] i druge. Antibiotici iz tetraciklinske grupe često se primenjuju u saniranju zapaljenja uterusa muznih krava [1]. U mleku tretiranih krava izlučuju se rezidue antibiotika različito dugo i u različitim koncentracijama [4, 5], a u zavisnosti, pre svega, od vrste antibiotika, oblika u kome je određen antibiotik aplikovan, veličine i.u. doze, intervala aplikacije, kao i od „težine” oboljenja [3]. Takvo mleko se odbacuje, ali iz raznih

* Rad primljen za štampu 24.12. 2003. godine

** Dr Vujadin Vuković, naučni saradnik, dr Nada Dugalić-Vrndić, naučni saradnik; Naučni Institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

razloga (nepoštovanje karence, neznanje, nemar itd), ipak dospeva do mlekarske industrije, kao i do potrošača, izazivajući veći broj štetnih efekata u preradi mleka i na zdravlje ljudi. U literaturi postoji više podataka u navođenju karence za izlučivanje mlekom rezidua pojedinih antibiotika iz tetraciklinske grupe posle intrauterine aplikacije [2, 6, 17]. Međutim, ti podaci su često nepodudarni i gotovo protivrečni. Upravo iz tih razloga, planom ovoga rada je predviđeno da se posle jednokratne intrauterine aplikacije oksitetraciklina u dve različite doze ispita vreme izlučivanja i koncentracija rezidua oksitetraciklina u mleku u funkciji vremena. Za određivanje rezidua oksitetraciklina u mleku korišćena je metoda Rezazurin testa [8], koja je modifikovana radi kvantitativnog dokazivanja [16].

Materijal i metode rada / Materials and methods

Ukupno 10 muznih krava istočno-frizijske rase, mlečnosti od 10 do 25 litara dnevno, podeljeno je u dve jednake grupe i tretirano preparatom *ad us vet.*, penušave oblate za uterus, koje sadrže 0,5 g oksitetraciklin hidrohlorida (u daljem tekstu- oksitetraciklin). Pri tome, ukupno pet krava je dobilo dozu od 0,5 g/životinji, a preostalih pet krava je dobilo dozu od 1 g/životinji. Terapija je bila jednokratna intrauterina. Uzorci mleka tretiranih krava uzimani su ručnom mužom u sterilisane bočice iz svake četvrti vimena i pomešani u zbirni uzorak. Vreme uzimanja uzoraka je bilo 10, 22, 34, 46, 58, 70, 82, 94 i 106 časova posle aplikacije leka, odnosno sve do dva uzastopna negativna nalaza na prisustvo rezidua za mleko iste krave. Posle doze od 0,5 g, uzorci mleka su uzimani najkraće 58 časova, odnosno najduže 82 časa posle aplikacije leka, a posle doze od 1g/kravi, uzorci mleka su uzimani najkraće 58 časova, odnosno najduže 106 časova posle aplikacije leka. Do ispitivanja uzorci mleka su čuvani u hladnjaku. Ispitivanje prisustva rezidua oksitetraciklina je izvođeno u sterilnim laboratorijskim uslovima metodom Rezazurin testa sa bakterijom *Str. thermophilus*, kao test mikroorganizmom. Za izvođenje testa, iz sterilisane bočice sa uzorkom, otpipetirano je 10 ml mleka u sterilnu epruvetu i zatim pasterizovano 5 minuta na temperaturi od 80 °C, a zatim rashlađeno do sobne temperature. Zatim je u rashlađeno mleko dodat 1 ml vodenog rastvora rezazurina (0,5 g/l). Dalje je dodat i 1 ml *Str. thermophilus*-a (18 časova stara kultura) razređenog obranim sterilnim mlekom u odnosu 1:1. Ovako pripremljen uzorak je promešan na vibratoru, a zatim inkubisan tokom 2 časa na temperaturi termostata od 45°C. Sadržaj epruvete je mešan okretanjem epruvete i to 1 i 1,5 časova posle početka inkubacije. Posle dvočasovne inkubacije rezultati su čitani na način predviđen za korišćenu metodu. Bela boja uzorka označava negativan nalaz, azurno-plava ili ružičasta boja označava pozitivan nalaz, a prelazna boja, između boje za negativan i pozitivan nalaz, označava sumnjiv nalaz. Prag osetljivosti ove metode za oksitetraciklin je 0,1 mcg/ml (sumnjiv nalaz), odnosno 0,2 mcg/ml mleka (pozitivan nalaz) [15]. Svaki uzorak mleka poreden je sa negativnom i pozitivnom kontrolom. Negativnu kontrolu je predstavljalo sterilno obrano

mleko kod koga je prethodno isključeno prisustvo rezidua antibiotika, a pozitivnu kontrolu je predstavljalo isto obrano mleko kojem je dodata određena količina oksitetraciklina. Radi kvantifikacije rezidua oksitetraciklina u mleku, ispitivani uzorci mleka su razblaživani obranim sterilnim mlekom koje ne sadrži rezidue antibiotika. Izračunavanje koncentracije oksitetraciklina u ml osnovnog uzorka obavljeno je korišćenjem formule $X = a \times b$, gde je (X) – nepoznata koncentracija oksitetraciklina, znak (a) – nivo osetljivosti metode za oksitetraciklin, i znak (b) – maksimalno razblaženje ispitivanog uzorka mleka u kome mogu da se dokažu rezidue oksitetraciklina.

Dobijeni rezultati su grupisani u odgovarajuće serije i statistički obrađeni korišćenjem matematičko-statističkih metoda.

Rezultati ispitivanja / Results

1. Rezidue oksitetraciklina u mleku posle jednokratne intrauterine aplikacije u dozi od 0,5 g/kravi / *Oxytetracycline residue in milk following single intrauterine application of dose of 0.5 g/cow*

Ogledi su izvedeni na 5 muznih krava kojima je jednokratno intrauterino aplikovan oksitetraciklin u dozi od 0,5 g/životinji, u periodu između dve muže. Uzorci mleka su uzimani iz svake četvrti vimena jedne krave i pomešani u zbirni uzorak sve do dva uzastopno negativna nalaza u pogledu prisustva rezidua oksitetraciklina.

1.1. Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom /

Duration of excretion of oxytetracycline residue with milk

Prestanak izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom tretiranih krava se odigrao između 34. i 58. časa oglada, odnosno prosečno 46,0 časova posle aplikacije leka (tabela 1).

Tabela 1. Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom posle jednokratne intrauterine doze od 0,5 g/kravi /

Table 1. Duration of excretion of oxytetracycline residue with milk following single intrauterine application of dose of 0.5 g/cow

Broj krave / Cow number	Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina (časovi) / <i>Time of sampling for oxytetracycline residue (hours)</i>
1.	46
2.	46
3.	34
4.	58
5	46
	Xsr = 46,00 SD = 9,80

Posle 34. časa oglada rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu u mleku jedne krave (krava broj 3). Posle 46. časa oglada prestalo je izlučivanje rezidua oksitetraciklina mlekom tri krave (krave broj 1, 2 i 5), a posle 58. časa oglada nisu mogle da se dokažu rezidue oksitetraciklina u mleku ni kod preostale krave (krava broj 4).

1.2. Koncentracija rezidua oksitetraciklina (mcg/ml mleka) u funkciji vremena /
Oxytetracycline residue concentration (mcg/ml milk) as time function

Počev od 10. časa oglada, rezidue oksitetraciklina su mogle da se dokažu u uzorcima mleka svih pet tretiranih krava i to u koncentraciji od 0,4 do 0,8 mcg/ml mleka, odnosno prosečno 0,6 mcg/ml mleka (tabela 2).

Tabela 2. Koncentracija rezidua oksitetraciklina (mcg/ml) u mleku krava posle jednokratne intrauterine aplikacije u dozi od 0,5 g/kravi /

Table 2. Oxytetracycline residue concentration (mcg/ml) in cow milk following single intrauterine application of dose of 0.5 g/cow

Broj krave / Cow number	Rezidue oksitetraciklina (mcg/ml mleka) / <i>Oxytetracycline residue (mcg/ml milk)</i>						
	Vreme oglada (časovi) / <i>Time of sampling (hours)</i>						
	10	22	34	46	58	70	82
1.	0,80	1,20	1,40	0,50	–	–	
2.	0,40	0,70	0,10	-	–		
3.	0,60	0,95	0,80	0,40	–	–	
4.	0,50	0,90	1,00	0,60	0,40	–	–
5.	0,70	1,00	0,80	0,20	–	–	

U daljem toku oglada, u mleku krava broj 1 i 4, povećavao se nivo rezidua do 34. časa oglada, kada je iznosio 1,4, odnosno 1,0 mcg/ml mleka, a zatim je ta koncentracija opadala do 46. časa oglada (krave broj 1), odnosno do 58. časa oglada u mleku krave broj 5. Posle navedenih vremena u mleku krava broj 1 i 4 nisu mogle da se dokažu rezidue oksitetraciklina. S druge strane, u mleku krava broj 2, 3 i 5 povećao se nivo rezidua u 22. času oglada, a zatim je koncentracija oksitetraciklina opadala do 34. časa oglada u mleku krave broj 2, kada je iznosila 0,1 mcg/ml, odnosno sve do 46. časa oglada u mleku krava broj 3 i 5, kada je iznosila 0,4, odnosno 0,2 mcg/ml. Rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu u mleku krava broj 2, 3 i 5, posle navedenih vremena. U toku celog oglada, koncentracija rezidua oksitetraciklina se kretala od 0,1 do 1,4 mcg/ml mleka.

2. Rezidue oksitetraciklina u mleku posle jednokratne intrauterine aplikacije u dozi od 1g/kravi /
Oxytetracycline residue in milk following single intrauterine application of dose of 1 g/cow

Ogledi su izvedeni na pet muznih krava kojima je u periodu između dve muže jednokratno intrauterino aplikovan oksitetraciklin u dozi od 1 g/životinji.

Uzorci mleka su uzimani od svih četvrti vimena jedne krave kao zbirni uzorak, sve do dva uzastopno negativna nalaza u pogledu prisustva rezidua oksitetraciklina.

2.1. Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom /

Duration of excretion of oxitetracycline residue with milk

Prestanak izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom se odigrao između 34. i 82. časa ogleda, odnosno prosečno 55,6 časova posle aplikacije leka (tabela 3).

Tabela 3. Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom posle jednokratne intrauterine aplikacije u dozi od 1 g/kravi /

Table 3. Duration of oxitetracycline residue excretion with milk following single intrauterine application of dose of 1 g/cow

Broj krave / Cow number	Vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina (časovi) / Time of sampling for oxitetracycline residue excretion (hours)
1.	46
2.	58
3.	58
4.	82
5.	34
Xsr = 55,60 SD = 17,16	

Posle 34. časa ogleda, rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu u uzorcima mleka jedne krave (krava broj 5), posle 46. časa ogleda, u uzorcima mleka još jedne krave (krava broj 1), posle 58. časa ogleda, u uzorcima mleka još dve krave (krave broj 2 i 3) i posle 82. časa ogleda, rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu ni kod jedne krave u ogledu (prestanak izlučivanja rezidua mlekom krave broj 5).

2.2. Koncentracija rezidua oksitetraciklina u funkciji vremena /

Oxitetracycline residue concentration as time function

U 10. času ogleda rezidue oksitetraciklina su mogle da se dokažu u uzorcima mleka svih krava u ogledu, a koncentracija je bila od 0,60 do 1,80 mcg/ml mleka. U ogledima sa mlekom krava broj 2 i 3, koncentracija rezidua antibiotika u mililitru mleka rasla je do 34. časa ogleda, kada je bila 1,70, odnosno 1,80 mcg/ml mleka, a zatim je opadala do 58. časa ogleda, kada je bila 0,60, odnosno 0,40 mcg/ml mleka. U daljem toku ogleda, rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu u uzorcima mleka krava broj 2 i 3 (tabela 4).

Tabela 4. *Koncentracija rezidua oksitetraciklina (mcg/ml) u mleku krava posle jednokratne intrauterine aplikacije u dozi od 1 g/kravi /*

Table 4. Oxitetracycline residue concentration (mcg/ml) in cow milk following single intrauterine application of dose of 1 g/cow

Broj krave / Cow number	Rezidue oksitetraciklina (mcg/ml mleka) / Oxitetracycline residue (mg/ml milk)								
	Vreme ogleda (časovi) / Time of sampling (hours)								
	10	22	34	46	58	70	82	94	106
1.	1,80	1,80	1,70	0,90	–	–			
2.	1,30	1,60	1,70	1,20	0,60	–	–		
3.	1,00	1,60	1,80	0,60	0,40	–	–		
4.	1,80	2,20	1,90	1,00	0,90	0,30	0,10	–	–
5.	0,60	0,30	0,50	–	–				

U mleku krave broj 1, koncentracija rezidua oksitetraciklina u 22. času ogleda ostala je ista, a kod krave broj 4 u 22. času ogleda koncentracija rezidua oksitetraciklina u mleku se povećala na 2,20 mcg/ml mleka. U mleku krave 1 i 4, u daljem toku ogleda, koncentracija rezidua oksitetraciklina u mleku opadala je sve do 46. časa ogleda u mleku krave broj 1, kada je iznosila 0,90 mcg/ml mleka, odnosno sve do 82. časa ogleda u mleku krave broj 4, kada je iznosila 0,10 mcg/ml mleka. Posle navedenih vremena, u mleku krava broj 1 i 4, rezidue oksitetraciklina nisu mogle da se dokažu korišćenjem metode Rezazurin testa. Dalje, u mleku krave broj 5, koncentracija rezidua oksitetraciklina se smanjila u 22. času ogleda, kada je iznosila 0,30 mcg/ml mleka, zatim se povećala u 34. času ogleda, kada je bila 0,50 mcg/ml mleka. Posle tog vremena, korišćenom metodom nisu mogle da se dokažu rezidue oksitetraciklina u mleku krave broj 5. U toku celog ogleda, koncentracija rezidua oksitetraciklina je bila od 0,1 do 2,2 mcg/ml mleka.

Diskusija / Discussion

Prema obavljenim ispitivanjima i dobijenim nalazima, rezidue oksitetraciklina mogu da se dokažu u mleku svih tretiranih krava i to prosečno 46,0 (34 – 58) časova posle intrauterine aplikacije u dozi od 0,5 g/kravi, odnosno prosečno 55,6 (34 – 82) časova posle intrauterine aplikacije u dozi od 1,0 g/kravi. Ovi nalazi, u principu, nisu u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Kaneene i saradnici [7] koji su dokazali oksitetraciklin u mleku krava 12,5 do 44 časa posle njegove intrauterine aplikacije u dozi od 3 g/kravi. Isto tako [11], utvrdili su da se oksitetraciklin, dat intrauterino u dozi od 5 mg/kg telesne mase, može da dokaže 6 do 12 časova u mleku tretiranih krava. S druge strane, nalazi Gedeka i sar. i Slee i Brightling [4, 13] približni su našim rezultatima sa dozom oksitetraciklina od

1 g/kravi. Naime, ovi autori su utvrdili da se oksitetraciklin, dat intrauterino u dozi od 1 g/kravi, izlučuje mlekom tokom četiri, odnosno pet muža. U našim ogledima sa dozom od 0,5, odnosno 1 g oksitetraciklina, koji su intrauterino aplikovani muznim kravama, koncentracija rezidua oksitetraciklina u mleku je rasla do 22. časa oglada, kada je iznosila 0,7- 1,2 mcg/ml, odnosno 0,3 do 2,2 mcg/ml mleka. Ovi nalazi nisu u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Slee i Brightling [13], koji su posle intrauterine aplikacije oksitetraciklina u dozi od 1g/kravi mogli da dokažu 0,3 mcg/ml i niže koncentracije rezidua oksitetraciklina u mleku. Međutim, isti autori daju podatke da se rezidue oksitetraciklina izlučuju u mleku intrauterino tretiranih krava u najvećoj koncentraciji tokom druge muže, kao i u našim ogledima (22. čas oglada). Suprotno ovim nalazima, Prasad i sar [11] dokazali su da rezidue oksitetraciklina dostižu najvišu koncentraciju u mleku prve muže, posle intrauterine aplikacije ovoga antibiotika.

Zaključak / Conclusion

U ovom radu je ispitana resorpcija oksitetraciklina posle intrauterinih doza od 0,5 i 1 g/kravi i izlučivanje rezidua mlekom tretiranih krava. Pri tome, praćeno je vreme izlučivanja rezidua oksitetraciklina mlekom tretiranih krava, kao i koncentracije rezidua oksitetraciklina u mleku svake ogledne krave u kontrolnim vremenima. Na osnovu obavljenih ispitivanja i dobijenih nalaza, mogu da se izvedu zaključci:

1. Posle intrauterinih doza od 0,5 i 1 g, rezidue oksitetraciklina se izlučuju mlekom svih tretiranih krava i to već u 10. času oglada i, takođe, mlekom svih tretiranih krava tokom 10. 22 i 34. časa oglada;
2. Rezidue oksitetraciklina se izlučuju mlekom prosečno 46,0 (34 do 58) časova, posle i.u. doze od 0,5 g/kravi, odnosno prosečno 55,6 (34 do 82) časova, posle i.u. doze od 1 g/kravi;
3. Prosečna koncentracija rezidua oksitetraciklina u mleku rasla je do 22. časa oglada, kada je bila 0,95 (0,7 do 1,2) mcg/ml mleka, posle i.u. doze od 0,5 g/kravi, odnosno prosečno 1,5 (0,3 do 2,2) mcg/ml mleka, posle i.u. doze od 1 g/kravi;
4. U toku celog oglada, koncentracija rezidua oksitetraciklina se kretala od 0,1 do 1,4 mcg/ml mleka, posle i.u. doze od 0,5 g/kravi, odnosno od 0,1 do 2,2 mcg/ml mleka, posle i.u. doze od 1g/kravi.

Literatura / References

1. Abd El Malek A. S., Zaki K.: Effect of Terramycin tablets on bacteric of puerperal infection in Friesian cows. J. Arab. Vet. Med. Ass. 24, 157- 166, 1964. - 2. Čupić V.: Zaostaci lekova u jestivim tkivima životinja, 1997. - 3. Fiebiger I.: Excretion of antibiotics with milk after their i.u. application to cows. Inaug. Dissert., Eerie Univers. Berlin, 110, 1976. - 4. Gedek W., Fastner S., Gunzler O.: Antibiotics residues in bovine milk after i.u. administra-

tion of commercial preparations. Tierärztliche Umschau 30 5, 223-227, 1975. - 5. Haaland M. A., Manspeaker J. E., Morteland T. W.: Antibiotics residues in milk after i.u. infusion. Vet. Med. and Small Animal Clinical, 79, 3, 382-386 (En 26 ref.), 1984. - 6. Jezdimirović Milanka: Osnovi farmakoterapije i gotovi lekovi *ad us. vet.*, 2002. - 7. Kaneene J. B., Coe P.H., Smith J.H., Rapnicki P., Smith C. L., Gerloff B., Morrow D. A.: Drug residues in milk after i.u. injection of oxitetracycline, lincomycin-spectinomycin and povidone-iodide in cows with metritis. Am. J. of Vet. Resear. 47, 6, 1363-1365, 1986. - 8. Leali L., Ruffo G. and Aliprandi L.: Study of antibiotics and inhibitory substances in milk. I antibiotics late 37, 10, 762-768, 1963. - 9. Mikhailov N. N., Murtazin B.: Treatment of puerperal endometritis in cows. Veterinarny (Moscow) No. 12, 83-87 (Ru), 1971. - 10. Moore C. W., Marnewick J. J., Henning A. C.: On the use of oxitetracycline in reducing the incidence of metritis in dairy cows. J. of the South African Vet. Ass. 55, 2, 65-65, 1984. - 11. Prasad S., Jayachandran C., Singh M.: Pharmacokinetic of oxitetracycline in dairy cows. Indian J. of Anim. Sci. 57, 2, 106-110, 1987. - 12. Seguin B. E., Morrow D. A., Oxender W. D.: Intrauterine therapy in the cows. J. of the Am. Vet. Med. Ass. 164, 6, 609-612, 1974. - 13. Slee K. J., Brightling P.: Antibacterial activity of cows milk following therapy with oxitetracycline uterine pessories. Australian Vet. J. 57, 3, 143-144, 1981. - 14. Trailović D., Petrujkić T.: Kliničko ispitivanje pomoćnog lekovitog sredstva Veter-U, Registracija, 2002. - 15. Vuković V.: Ispitivanje nivoa osetljivosti metoda Delvo i Rezazurin testa na prisustvo rezidua penicilina i oksitetraciklina u mleku. Veterinarski glasnik, 55, 1-2, 55-59, 2001. - 16. Vuković V.: Resorpcija penicilina, streptomicina i oksitetraciklina posle intrauterinog davanja i izlučivanje mlekom. Doktorska disertacija, Beograd, 196, 1991. - 17. Živanov D.: Rezidue i karenci hemoterapeutika i pesticida u hrani animalnog i biljnog porekla. Krmiva, 29, 11, 12, 277-281, 1987.

ENGLISH

OXITETRACYCLINE RESIDUE IN COW MILK AFTER INTRAUTERINE APPLICATION

V. Vuković, Nada Dugalić-Vrndić

The paper examines the excretion of oxitetracycline residue in milk of East Friesian cows that received a single intrauterine treatment. A total of 10 cows were divided into two equal experimental groups, and one group was administered a dose of 0.5 g/cow, and the other group 1 g/cow oxitetracycline. Oxitetracycline residue in milk was determined using the Rezazurin test method with *Str. Thermophilus*, as the test microorganism. Following the i.u. administration of oxitetracycline in a dose of 0.5 g/cow, the average duration of the presence of its residue in milk in treated cows was 46.0 (34-58) hours, with oxitetracycline residue concentration ranging from 0.1-1.4 mcg/ml milk. After the dose of 1 g/cow, this time period was 55.6 (34-82) hours, and the oxitetracycline residue concentration ranged from 0.1-2.2 mcg/ml milk.

Key words: cow milk, residue, intrauterine application

ОСТАТКИ ОКСИТЕТРАЦИКЛИНА В МОЛОКЕ КОРОВ ПОСЛЕ ВНУТРИ-МАТОЧНОЙ АППЛИКАЦИИ

В. Вукович, Надя Дугалич-Врндич

В этой работе испытано выделение остатков окситетрациклина молоком коров восточно-фризийской породы, которые однократно внутриматочно лечены. При этом, совокупно 10 коров разделено в две одинаковые опытные группы, из которых одна группа получила дозу от 0,5 г/корове, а вторая группа дозу окситетрациклина от 1 г/корове. Испытание присутствия остатков окситетрациклина в молоке совершено методом Резазурин теста с *Str. thermophilus*-ом, как тест микроорганизмом. После в.м. дозы окситетрациклина от 0,5 г/корове, среднее время выделения остатков молоком леченных коров 46,0 (34 до 58) часов, при чём концентрация остатков окситетрациклина двигалась от 0,1 до 1,4 мцг (мл молока, а после дозы от 1г/корове, это время составляет (в сумме) 55,6 (34 до 82) часа, при чём концентрация остатков окситетрациклина двигалась от 0,1 до 2,2 мцг/мл молока.

Ключевые слова: молока коров, остатки, внутриматочно леченые

**ISPITIVANJE DVE ORALNE REHIDRACIONE SOLUCIJE U
TRETMANU PRASADI SA AKUTNIM GASTROENTERITISOM***

***INVESTIGATIONS OF TWO ORAL REHYDRATION SOLUTIONS IN
TREATMENT OF PIGLETS WITH ACUTE GASTROENTERITIS***

Tamara Vukavić, R. Došen, Jasna Ličina**

Osnovni poremećaj kod akutnog gastroenteritisa jeste poremećaj transportovanja vode i elektrolita, različitog stepena. Cilj ispitivanja bio je da se oceni efikasnost dve oralne rehidracione solucije (ORS) u tretmanu akutnog gastroenteritisa kod prasadi na sisi.

Pedeset prasadi, 20 sa akutnim gastroenteritisom i 30 zdravih kontrola u uzrastu od deset dana, odabrano je metodom slučajnog izbora pri pojavi proliva, za jedan od dva ORS tretmana (ORS-1 i ORS-2). Prasad koja imaju proliv dobila su probiotik per os prvoga dana i antibiotik parenteralno, do prestanka proliva. Sva prasad su klinički praćena od 1. do 6. dana ispitivanja. Uzorci fecesa za bakteriološku kulturu uzorkovani su prvog dana.

*Klinički znaci hidracije bili su bolji, kao i razlika u telesnoj masi prasadi koja su imala proliv pod ORS-2 tretmanom koja je bila signifikantno veća ($p=0,036$) u poređenju sa razlikom kod prasadi pod ORS-1 tretmanom. Sva prasad koja su imala proliv, šestog dana su imala normalno formiran feces. *E. coli* je izolovana iz fecesa 48 prasadi.*

Prasad sa akutnim gastroenteritisom tretirana ORS, koja ima viši osmolaritet i sadrži umesto citrata, bikarbonate u većoj koncentraciji, uz manje kalijuma, više natrijuma i više hlora, imala su bolje stanje hidracije, uz signifikantno veću razliku u telesnoj masi, a njihova kontrolna grupa nesignifikantno, u odnosu na prasad tretiranu oralnom rehidracionom solucijom drugačijeg sastava.

Ključne reči: prasad na sisi, akutni gastroenteritis, proliv

* Rad primljen za štampu 28. 11. 2003. godine

** Dr Tamara Vukavić, profesor, Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine, Novi Sad; mr Radoslav Došen, istraživač saradnik, dr vet. med. Jasna Ličina, istraživač pripravnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Uvod / Introduction

Akutni gastroenteritis je čest uzrok uginuća prasadi na sisi i može da prouzrokuje velike ekonomske gubitke na farmama, naročito u periodu odgoja prasadi pre zalučenja [1, 2, 3, 4]. U okviru ukupnog mortaliteta prasadi pre zalučenja, koji iznosi 15 do 20 posto, akutni gastroenteritis je najčešći uzrok uginuća [1, 5, 6].

Poremećaj transportovanja vode i elektrolita u gastrointestinalnom traktu čini patološko-fiziološku osnovu akutnog gastroenteritisa. Ovaj poremećaj može da bude različitog intenziteta, od blagog do teškog, a nekada i sa fatalnim ishodom. Zbog toga je logično da osnov tretmana akutnog gastroenteritisa bude nadoknada vode i elektrolita, bez obzira da li je neka druga terapija uključena ili ne. Cilj ovog ispitivanja bio je da se proceni efikasnost dva preparata za oralnu rehidraciju (ORS) u tretmanu akutnog gastroenteritisa kod prasadi na sisi.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 50 prasadi-meleza (landras x velika bela svinja), u uzrastu od deset dana. Oprasilo ih je 8 zdravih krmača (pet prvopraskinja, tri višepraskinje), bez indukcije prašenja. U ogled su uključena prasad prvopraskinja, zato što se akutni gastroenteritis mnogo češće javlja kod njihove prasadi nego kod prasadi starijih krmača. Prasad prvopraskinja su kod rođenja manje telesne mase i sporije napreduju nego prasad starijih krmača. Posle prašenja, krmačama je aplikovan oksitetraciklin i.m radi prevencije postpartalnih infekcija. Metodom slučajnog izbora odabirana su prasad na sisi koja su uključena u ispitivanje dve oralne rehidracione solucije koje se koriste za rehidraciju dece sa akutnim prolivom (tabela 1). Za svaku ORS, formirana je po jedna eksperimentalna grupa (prasad na sisi sa prolivom): ORS-1 i ORS-2 i po jedna kontrolna grupa (prasad na sisi bez proliva): ORS-1K i ORS-2K. Sva prasad su obe ORS pila slobodno po volji, bez ograničenja, tokom celog trajanja ispitivanja.

Prvog dana sva prasad su primila i po jednu tabletu probiotika (*Lactobacillus Reuteri*, per os). Osim ovoga, prasad sa prolivom (eksperimentalne grupe ORS-1 i ORS-2) lečena su i antibioticima (kombinacija cefalosporin-neomicin-penicilin, kao rutinska terapija na farmi na kojoj je ispitivanje obavljeno), sve do prestanka proliva.

Ispitivanje je planirano tako da se svako prase individualno prati od početka (dan 1) do kraja ogleda (dan 6). Svakodnevno je obavljen klinički pregled, sa posebnim osvrtom na registrovanje izgleda fecesa i stepen dehidracije kod prasadi koja imaju proliv (procena boje kože, tonusa kože i očnih jabučica, suvoća dlake, pospanost, nestabilan hod i nesposobnost ustajanja). Prasadi je izmerena telesna masa prvog i šestog dana ispitivanja. Feces za bakteriološki pregled uzorkovan je prvog dana samo od prasadi koja imaju proliv.

Tabela 1. Sastav dve ORS koje se koriste u tretmanu akutnog gastroenteritisa
Table 1. Composition of two ORS used in treatment of acute gastroenteritis

	ORS - 1	ORS - 2
Natrijum (mmol/L) / Sodium (mmol/L)	60	65
Kalijum mmol/L) / Potassium (mmol/L)	25	20
Hlor (mmol/L) / Chlorine (mmol/L)	55	60
Glikoza (mmol/L) / Glucose (mmol/L)	111	111
Citrat (mmol/L) / Citrate (mmol/L)	10	–
Bikarbonati (mmol/L) / Bicarbonates (mmol/L)	–	25
Osmolaritet (mOsm/L) / Osmolarity (mOsm/L)	261	281

Statistička analiza je rađena korišćenjem t-testa i ekzaktnog testa verovatnoće po Fisheru.

Rezultati ispitivanja / Results

Prvog dana ispitivanja nije ustanovljena bitna razlika u telesnoj masi između prasadi u grupi ORS-1 i ORS-2 ($p=0,14$), ORS-1K i ORS-2K ($p=0,618$), ORS-1 i ORS-1K ($p=0,22$), ORS-2 i ORS-2K ($p=0,818$). Prosečan prirast u telesnoj masi prasadi od prvog do šestog dana bilo je značajan u obe eksperimentalne i obe kontrolne grupe. Međutim, kod dva praseta iz ORS-1 i dva praseta iz ORS-1K grupe, došlo je do pada u telesnoj masi ($-0,19$ i $-0,72$ kg; $-0,41$ i $-0,49$, po redosledu navođenja).

Šestog dana ispitivanja nije nađena signifikantna razlika u telesnoj masi između prasadi u ORS-1 i ORS-1K ($p=0,095$), ORS-2 i ORS-2K ($p=0,199$) ili ORS-1K i ORS-2K ($p=0,199$). Ali tada, na kraju ispitivanja, prasad iz grupe ORS-2 imala su značajno veću telesnu masu nego prasad iz grupe ORS-1 ($p=0,036$) (tabela 2). Klinički podaci o konzistenciji fecesa, tonusu kože i bulbusa prikazani su u tabeli 3.

Šestog dana ispitivanja, u grupi ORS-1, dva praseta su pokazala znake dehidracije u odsustvu proliva – kod dva praseta je konstatovan smanjen turgor kože, a kod jednog od njih i tonus bulbusa, uz smanjenje telesne mase. Druga dva praseta u istoj grupi imala su nestabilan hod, a jedno prase je bilo po-spuno. Ukupan broj bakterija/g fecesa uzetog od sisančadi koja su imala proliv, kretao se od 0,12 do 5,00¹² ($X \pm SD$, $2,39 \pm 1,82^{12}$; medijana 3,1¹²). *E. coli* je bila prisutna u 48 od 50 uzoraka fecesa. Drugi sojevi, navedeni po redosledu učestalosti, bili su: *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Enterobacter* sp. i *Bacillus* sp; *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* sp; *E. coli* heamolytica i *Clostridium* sp. Potencijalno patogeniji sojevi (*Staphylococcus* sp, *Corynebacterium* sp. i *E. coli* heamolytica) izolovani su iz fecesa prasadi eksperimentalne grupe koja su tretirana sa ORS-2.

Tabela 2. Telesna masa (kg) na početku i na kraju ispitivanja u eksperimentalnim (ORS-1, ORS-2) i kontrolnim (ORS-1K, ORS-2K) grupama na ORS tretmanu, $X \pm SD$ (rasponi), medijana i p (*) vrednosti

Table 2. Body mass (kg) at beginning and end of investigations in experimental (ORS-1, ORS-2) and control (ORS-1K, ORS-2K) groups on ORS treatment, $X \pm SD$ (ranges), median and p(*) values

Grupa / Group	Dan 1 / Day 1	Dan 6 / Day 6	Napredovanje / Progress dan 1-6 / Day 1-6
ORS-1 (n=10)	2.53±0.61 * ¹ (1.85-3.90) 2.39	2.99±0.77 * ¹ (1.43-4.00) 2.95	0.47±0.58 (- 0.72-1.36) 0.59
ORS-1K (n=19)	2.80±0.39 * ² (2.10-3.70) 2.75	3.52±0.78 * ² (1.71-5.00) 3.65	0.75±0.65 (- 0.49-2.00) 0.70
ORS-2 (n=10)	2.84±0.51 * ³ (2.05-3.62) 2.95	3.74±0.55 * ³ (3.12-4.76) 3.49	0.90±0.56 (0.12-1.86) 0.88
ORS-2K (n=11)	2.89±0.51 * ⁴ (2.30-3.70) 2.90	3.82±0.46 * ⁴ (2.84-4.44) 3.85	0.93±0.39 (0.37-1.82) 0.93

*¹ 0.015, *² 6.29E-05, *³ 0.0003 *⁴ 7.22E-06

Tabela 3. Klinički pregled prasadi sa akutnim gastroenteritisom (n=20) i kontrola (n=30), pre i posle tretmana sa ORS /

Table 3. Clinical picture of piglets with acute gastroenteritis (n=20) and controls (n=30), before and after treatment with ORS

Simptomi / Symptoms		Grupe / Groups							
		ORS-1		ORS-1K		ORS-2		ORS-2K	
		dan 1. / day 1	dan 6. / day 6	dan 1. / day 1	dan 6. / day 6	dan 1. / day 1	dan 6. / day 6	dan 1. / day 1	dan 6. / day 6
Feces / Faeces	normalan / normal	–	10	19	19	-	10	11	11
	kašast / mushy	2	–	–	–	7	–	–	–
	tečan / liquid	8	–	–	–	3	–	–	–
Tonus kože / Skin tonus	normalan / normal	5	8	10	10	3	10	10	10
	snižen / lower	5	2	–	–	7	–	–	–
Tonus bulbusa / Eye tonus	normalan / normal	7	9	19	19	10	10	11	11
	snižen / lower	3	1	–	–	–	–	–	–

Diskusija / Discussion

Osnovna razlika u sastavu dva preparata za oralnu rehidraciju korišćena u tretmanu sisančadi sa akutnim gastroenteritisom, bila je veća osmolalnost (281:261 mOsmol/L) i veći alkalni sadržaj (bikarbonat 25 mmol/L) ORS-2. Čak i ako se veći nivo bikarbonata koriguje za veći sadržaj u hloru, ORS-2 još uvek ima dvostruko veći sadržaj alkalija od ORS-1.

Odnos glikoza:natrijum u oba rastvora ORS-1 (1,85) i ORS-2 (1,71) u okviru je preporučenog odnosa za optimalnu apsorpciju natrijuma i vode [7] u iznosu 1,5 do 2. Sadržaj glikoze od 111 mmol/L, ne samo da je dobar dodatni izvor energije tokom akutnog oboljenja, nego omogućuje i poboljšanu apsorpciju vode i olakšanu apsorpciju natrijuma [8, 9]. Iako je, teoretski, veća osmolarnost ORS-2 mogla da izazove izvesno povlačenje vode u crevni lumen, verovatno da to nije bio slučaj, jer je napredovanje prasadi sa akutnim gastroenteritisom u eksperimentalnoj ORS-2 grupi bilo bolje nego u eksperimentalnoj grupi ORS-1. Prasad u okviru kontrolne grupe ORS-2K takođe su bolje napredovala, iako ne značajno. Odnos broja fecesa tečne i kašaste konzistencije u dve eksperimentalne grupe (8:2 u ORS-1 i 3:7 u ORS-2) bio je obrnut, na štetu ORS-1. I telesna masa prasadi u toj grupi bila je manja, iako ne značajno. Ovo ukazuje na negativan uticaj početno lošijeg statusa prasadi iz ORS-1 grupe na njihov kasniji klinički status (znaci dehidracije kod dva praseta, sa gubitkom telesne mase kod jednog praseta, šestog dana ispitivanja). Znatno bolje napredovanje prasadi u grupi ORS-2 moglo bi se pripisati njihovom povoljnijem statusu prvog dana ispitivanja. Međutim, napredovanje prasadi u kontrolnoj grupi kojoj se davao ORS-2 ($0,93 \pm 0,39$ kg) bilo je takođe bolje nego napredovanje prasadi u kontrolnoj grupi prasadi koja su dobijala ORS-1 ($0,75 \pm 0,65$ kg), iako ne značajno (tabela 2). Takođe, potencijalno više patogeni sojevi (*Staphylococcus* sp, *Corynebacterium* sp. i *E. coli* *heamolytica*), koji su mogli da izazovu ozbiljniji tok proliva, iskultivisani su samo iz fecesa prasadi koja su primala ORS-2. Sve ovo upućuje na mogućnost da je faktor koji je doprineo razlici u napredovanju između dve eksperimentalne (signifikantna) i kontrolne grupe (nesignifikantna), drugačiji sastav oralne rehidracione solucije koje su korišćene, a ne razlike u početnom kliničkom statusu prasadi, uključujući čak i „težinu” proliva. ORS-2 sadrži više bikarbonata koji su mogli da učine crevni sadržaj alkalnijim, što favorizuje veći rast patogenih bakterija. Isto tako, ORS-2 ima viši osmolalitet koji je mogao da dovede do izvesnog povlačenja vode iz cirkulacije u crevni lumen, sa konsekutivnim smanjenjem konzistencije fecesa. Sa druge strane, više hlora u ORS-2 moglo je da ima negativan uticaj na rast bakterija. Da li je ovo poslednje imalo pozitivni uticaj i na veće razlike u telesnoj masi u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi prasadi koja su pomena ORS-2 (tabela 2), zahteva verifikaciju u ispitivanju većeg obima. Bakterije izolovane iz fecesa prasadi sa akutnim gastroenteritisom bile su uglavnom potencijalno patogeni sojevi (*E. coli*, *Staphylococcus* sp.), mada takođe i potencijalno nepatogeni sojevi (*Enterococcus* sp. i *Enterobacter* sp.). Hemolitična *E. coli* i

Clostridium sp. izolovane su iz po jednog fecesa. Kada se ovi rezultati uporede sa rezultatima dobijenim pri izbijanju proliva kod novorođene prasadi u jednom ranijem ispitivanju [10], vidi se da je ukupan broj bakterija u fecesu prasadi iz tog ispitivanja bio mnogo veći nego kod prasadi stare 10 dana u okviru ovog ispitivanja, u kome je samo iz jednog uzorka fecesa izolovan potencijalno patogeni soj *Clostridium* sp.

Zaključak / Conclusion

1. Na osnovu kliničkih pokazatelja dehidracije, prasad eksperimentalne grupe sa akutnim gastroenteritisom, koja su pojena ORS koja ima viši osmolalitet i sadrži, umesto citrata, bikarbonate u višoj koncentraciji, uz manje kalijuma, više natrijuma i više hlora, u 6. danu su imala bolju hidraciju od prasadi pojene drugom solucijom.

2. Osim toga, prasad iz iste grupe, imala su signifikantno veću, a njihove kontrole nesignifikantno veću razliku u telesnoj masi na kraju ispitivanja, u odnosu na prasad tretiranu ORS, drugačijeg sastava.

Moguća povoljna uloga male razlike u koncentraciji hlora predmet je daljeg ispitivanja.

Istraživanja su deo projekta 4331 koje finansira MNTR.

Literatura / References

1. Alexander J. T. L.: Neonatal diarrhoea in pigs. Gyles C.L, Wallingford V.U, eds In: *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International: 151-70, 1994.
- 2. Biehl L. G., Hoefling D. C.: Diagnosis and treatment of diarrhoea in 7 to 14-day-old pigs. *J Am Vet Assoc*; 188, 1144-46, 1986.
- 3. Niewold T. A. *et al.*: A review of porcine pathophysiology: a different approach to disease. *Vet Quart*, 22, 209-12, 2000.
- 4. Svensmark B. *et al.*: Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. *Acta Vet Scand*, 30, 63-70, 1989.
- 5. Cutler R. S. *et al.*: Prewaning Mortality. In: Straw B. E *et al.*, eds. *Diseases of swine*, 8th ed, ISUP Ames, Iowa, 985-992, 1999.
- 6. Morin M. *et al.*: Neonatal diarrhoea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks. *Can J Comp Med*, 47, 11-15, 1983.
- 7. Michael J. G.: Studies of oral rehydration solutions in animal models. *Clin Therapeut*, 12, 5-61, 1990.
- 8. Saunders D. R., Sillery J. K.: Absorption of carbohydrate-electrolyte solutions in rat duodeno-jejunum. Implications for the composition of oral electrolyte solutions in man. *Dig Dis Sci*, 30, 154-60, 1985.
- 9. Vukavić Tamara *et al.*: Gut flora in pigs. Part II. Predominant faecal bacteria in newborn pigs with diarrhoea before and after 48h of the treatment. *Proc Nat Sci (Matica Srpska)*, 90, 35-40, 1996.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF TWO ORAL REHYDRATION SOLUTIONS IN TREATMENT OF PIGLETS WITH ACUTE GASTROENTERITIS

Tamara Vukavić, R. Došen, Jasna Ličina

The basic disorder in acute gastroenteritis is the disrupted transport of water and electrolytes, to a different degree. The objective of these investigations was to evaluate the efficacy of two oral rehydration solutions (ORS) in the treatment of acute gastroenteritis in suckling piglets. Fifty piglets, 20 with acute gastroenteritis and 30 healthy controls aged 10 days were chosen at random upon the incidence of diarrhea, for one of two ORS treatments (ORS-1 and ORS-2). The piglets with diarrhea were administered a probiotic *per os* on the first day and an antibiotic parenterally, until the diarrhea disappeared. All the piglets were followed clinically from days 1-6 of the investigations. Faeces samples were taken for bacteriological culture on the first day. Clinical signs of hydration were better, as well as the difference in body mass of piglets with diarrhea under the ORS-2 treatment, which was significantly higher ($p=0.036$) in comparison with the difference in piglets under the ORS-1 treatment. All piglets with diarrhea had normally formed faeces on the sixth day. *Escherichia coli* was isolated from faeces of 48 piglets. Piglets with acute gastroenteritis, treated with ORS with a higher osmolarity and which contained instead of citrate, bicarbonates in higher concentrations, with less potassium, more sodium and more chlorine, had a better state of hydration, with a significantly bigger difference in body mass, and the results of their control group were not significantly different against those of piglets treated with ORS of a different composition.

Key words: Suckling piglets, acute gastroenteritis, diarrhea.

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ДВУХ ОРАЛЬНЫХ РЕГИДРАЦИОННЫХ СОЛЮЦИЙ В ЛЕЧЕНИИ ПОРОСЯТ С ОСТРЫМ ГАСТРОЭНТЕРИТОМ

Тамара Вукавич, Р. Дошен, Ясна Личина

Основное расстройство у острого гастроэнтерита, транспорта воды и электролита, различной степени. Цель испытания была оценить эффективность двух оральных регидрационных солюций (ОРС) в лечении острого гастроэнтерита у поросят на подсосе.

Пятьдесят поросят, 20 с острым гастроэнтеритом и 30 здоровых, контроль возраста десять дней, отобрано методом случайного выбора при явлении поноса, для одного из двух ОРС лечения (ОРС-1 и ОРС-2). Поросята с поносом получили пробиотик *per os* первого дня и антибиотик парантерально, до прекращения поноса. Все поросята клинически слезены от 1-6 дней испытания. Образчики помёта для бактериологической культуры образчикованы первого дня.

Клинические знаки гидрации были лучше, словно и разница в массе тела поросят с поносом под ОРС-2 лечением, которая была сигнификантно больше ($p=0,036$) в сравнении с разницей у поросят под ОРС-1 лечением. Все поросята с

поносом, шестого дня имели нормально сформированный помёт. *E. coli* изолирована из помёта 48 поросят.

Поросята с острым гастроэнтеритом, леченные с ОРС, имеющая высший осморалитет и содержит вместо цитратов, бикарбонаты в большей концентрации, с меньше калия, больше натрия и больше хлора, имели более хорошее состояние гидрации, с сигнификантно большей разницей в массе тела, а их контрольная группа несигнифакантно, в отношении поросят, леченные с ОРС другого состава.

Ключевые слова: поросята на подсосе, острый гастроэнтерит, понос

**INCIDENCE OF EPULIDES IN THE DOG – A
RETROSPECTIVE HISTOPATHOLOGICAL STUDY***
*UČESTALOST EPULIDA KOD PASA – RETROSPEKTIVNA
HISTOPATOLOŠKA ISTRAŽIVANJA*

I. Dinev, I. Borissov, D. Dimov**

The retrospective histopathological study of 468 samples of tumour material obtained from dogs, referred to the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora during the period 1991-2000 showed that 29 specimens (6.19%) were epulides.

According to their histogenesis, the lesions were classified in two primary groups: reactive lesions – 37.94% and peripheral odontogenic tumours – 62.06%. Epulides were most commonly encountered in males (68.96%) compared to females (31.04%). The average age of affected dogs was 4 years for both genders. In 18 cases (62.06%), the lesions were mandibular whereas in 11 (37.94%) – maxillar. The highest predilection to epulides was observed in German Shepherds – 27.58%.

Key words: dogs, epulides, incidence

Introduction / Uvod

Epulides are among the most frequently encountered oral pathological lesions in the dog [1, 9, 11]. The term epulis means a non-specific growth of the gingiva. This is a clinical term that participates in diagnoses only accompanied by an adjective – for instance, giant cell epulis, acantomatous epulis etc. [5]. The same author divides epulides into two principal classes: reactive lesions and peripheral odontogenic tumours. The first group includes the fibrous epulis, the pyogenic granuloma, the giant cell epulis and reactive exostoses. The second group of neoplasms comprises the fibromatous epulis (odontogenic fibroma), the acantomatous epulis and the calcifying epithelial odontogenic tumour [4]. In some studies, the reactive lesions are said to be predominant while in others – odonto-

* Rad primljen za štampu 17.2. 2004. godine

** Assoc. prof. Ivan Dinev, Dept. of General and Clinical Pathology, I. Borissov, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora; D. Dimov, Faculty of Veterinary Medicine, University of Forestry, Sofia, Bulgaria

genic tumours are reported to be more prevalent [3, 1, 11, 12]. The reports by some authors show a higher incidence of epulides originating from the maxillar gingiva whereas those of others – from the mandibula [3, 7, 12]. The average age with the highest risk of the onset of epulides is between 6 and 8-9 years [6, 11]. In a study on 189 dogs with epulides, Toshida et al. (1999) observed a higher predisposition in Scotland Shepherds and Tzvetkov [11] – in German Shepherds. Other authors have not observed any breed-related predisposition [3, 9]. Neoplasms are more commonly encountered in male dogs [11, 12].

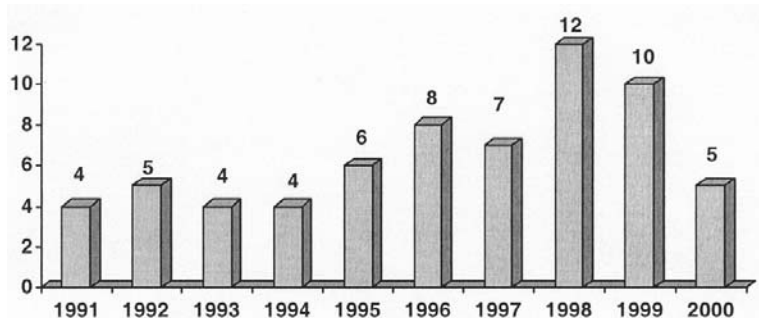
The histogenesis, the development and the prognosis of epulides could be most commonly determined using morphological criteria [13]. The aim of the present study was to determine the type of lesions, clinically determined as epulides via histopathological methods as well as their incidence depending on the breed, gender and age of the host with regard to the application of results as prognostic criteria in the diagnostics of tumours.

Material and methods / Materijal i metode rada

The studies were performed within the period 1991-2000 at the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University – Stara Zagora. A total of 468 samples from spontaneous tumour growths were obtained by excision or biopsy. Specimens for the histological study were fixed in 10% neutral formaldehyde and processed using the routine histological technique. Cross-sections were stained with haematoxylin/eosin (H/E).

Results / Rezultati ispitivanja

From all 468 samples, 65* (13.88%) originated from the oropharyngeal region. Twenty-nine (44.61%) of them or 6.19% of the total number of tumours



Graph 1. Incidence fo oral neoplasms in the dog for the period 1991-2000.
Grafikon 1. Pojava oralnih neoplazmi kod pasa u periodu od 1991 do 2000. godine

* The cases of oral papillomatosis are not included because of the specifics of its etiology.

were determined as epulides. In eighteen cases (62.06%) the lesions were localized to the mandibular and in eleven (37.94%) – to the maxillar gingiva.

Table 1 presents the incidence of epulides depending on the breed, gender and age of hosts. The highest percentage of affected dogs was that of German Shepherds – 27.58%. Then followed Collies, Irish Setters (13.8% each) and Bologneses, Boxers and mixed-breed animals (10.34% each). The incidence of epulides in Dogues (6.9%), Dachshunds and Drathaars (3.44%), that are among the commonly encountered breeds in our country, was relatively low.

Table 1. Incidence of epulides in the dog depending on the breed, gender and age of the host /

Tabela 1. Pojava epulida kod pasa u zavisnosti od rase, roda i starosti domaćina

Breed / <i>Rasa</i>	Average age, yrs / <i>Prosečna starost, god.</i>	Gender / <i>Rod</i>				Total / <i>Ukupno</i>	
		Male / ženski		Female / muški			
		n	%	n	%	n	%
1. German Shepherd / <i>Nemački ovčar</i>	4.5	5	17.24	3	10.34	8	27.58
2. Collie / <i>Koli</i>	5	4	13.80	–	–	4	13.80
3. Irish Setter / <i>Irski seter</i>	6.5	2	6.90	2	6.90	4	13.80
4. Boxer / <i>Bokser</i>	3	2	6.90	1	3.44	3	10.34
5. Dogue / <i>Doga</i>	6	2	6.90	–	–	2	6.90
6. Bolognese / <i>Bolonezer</i>	4.5	2	6.90	1	3.44	3	10.34
7. Dachshund / <i>Daksund</i>	2	–	–	1	3.44	1	3.44
8. Drathaar / <i>Dratar</i>	1	1	3.44	–	–	1	3.44
9. Mixed-breed / <i>Mešanac</i>	3.5	2	6.90	1	3.44	3	10.34
Total / <i>Ukupno</i>	4	20	68.96	9	31.04	29	100

Epulides were more frequent among male dogs – 68.96% vs 31.04% in females. The average age of affected dogs in both genders was 4 years.

Macroscopically, the lesions appeared as irregular masses with a diameter from 1-2 to 8-10 cm in all cases. The cutting surface was thick. In some cases, the surface was ulcerated.

Table 2. Incidence of epulides in the dog depending on the histological diagnosis /
Tabela 2. Pojava epulida kod pasa u zavisnosti od histološke dijagnoze

Epulides / Epulide					
Reactive lesions / <i>Reaktivne lezije</i>	n	%	Peripheral odontogenic tumours / <i>Periferni odontogeni tumori</i>	n	%
Fibrous epulis / <i>Fibrozni epulis</i>	4	13.8	Fibromatous epulis (odontogenic fibroma) / <i>Fibromatozni epulis</i> (odontogeni fibrom)	8	27.58
Giant cell epulis / <i>Epulis džinovskih ćelija</i>	6	20.7			
Pyogenic granuloma / <i>Pirogeni granulom</i>	1	3.44	Acantomatous epulis / <i>Akantomatozni epulis</i>	10	34.48
Total / <i>Ukupno</i>	11	37.94	Total / <i>Ukupno</i>	18	62.06

The incidence of epulides depending on the histological diagnosis is shown in Table 2. Lesions determined as peripheral odontogenic tumours were prevalent (62.06%) whereas those determined as reactive lesions were less present 37.94%. The parenchyma of the most commonly encountered tumour – the acantomatous epulis, consisted of islets and bands of epithelial cells, embedded by a connective tissue stroma. The basal cells of the parenchyma were with a pallisade-like arrangement, sometimes with a vacuolated cytoplasm. An inverse polarity was also observed (Fig. 1).



Figure 1. Acantomatous epulis in a 4-year-old Boxer. H/E, × 300
Slika 1. Akantomatozni epulis kod četvorogodišnjeg boksera. H/E, x 300

The structure of odontogenic tumours with the next frequency (in descending order) – fibromatous epulides (odontogenic fibromas) was from a primary cellular type. The parenchyma consisted of fibroblast cells and remnants of

odontogenic epithelium and was characterized with a high degree of vacuolization (Fig. 2).

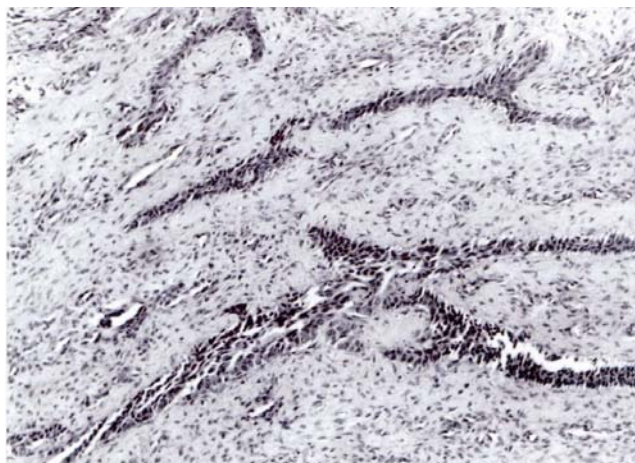


Figure 2. *Fibromatous epulis in a 6-year-old German Shepherd, H/E, × 240*
Slika 2. Fibromatozni epulis kod šestogodišnjeg nemačkog ovčara. H/E, x 240

Reactive lesions were determined according to the respective histological features. The parenchyma of the most widespread type, that of the giant cell epulis, consisted of intensely vacuolated fibroblast tissue with multinuclear giant cells within. The parenchyma of the other lesions from this group – fibrous epulis and pyogenic granuloma, showed a focal fibrous hyperplasia in the former and a marked granulation tissue with endothelial proliferation in the latter type, respectively.

Discussion / Diskusija

The results of our studies confirmed the high incidence of epulides among oral pathological lesions in dogs [1, 4, 12, 8]. Nearly half of the oral tumour growths, we observed during the period of the study, were from this neoplastic type (44.61%) [14]. In this respect, our results are similar to those of authors supporting the thesis that epulides are among the commonest oral neoplasms [15, 11]. The highest prevalence of epulides in German Shepherds, observed by us, is comparable to the incidence reported by Tzvetkov [11]. Probably, this frequency is due to the wide-ranging distribution of this breed in the region [7, 12].

Our studies evidenced that the average age of the onset of epulides was 4 years. During the last decade, there is a tendency towards the appearance of tumour formations in a younger age compared to other periods [1, 10, 6, 7].

The prevalence of epulides among male individuals is similar to that, stated by others [7, 11, 12]. As to the localization (on the maxillar or the mandibular gingiva), we could hardly establish any predisposition because of the contradictory data [3, 6, 7, 2, 12].

The results of our histopathological studies, according to the criteria of Gardner [5], evidenced a dominating prevalence of peripheral odontogenic tumours (acantomatous and fibromatous epulis) – 62.06% vs the reactive lesions (fibrous epulis, giant cell epulis and pyogenic granuloma) – 37.94%. These data correlated with the data of Reichart et al. [9], Hoffman and Gaengler, [7]; Yoshida et al., [12] but not with those reported by Tzvetkov [11] who affirmed that giant cell epulides were the commonest.

The analysis of our results confirmed the primary importance of histological investigation for the confirmation of the diagnosis and for the prognosis of lesions, determined as epulides.

References / Literatura

1. Bastianello S. S.: A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. The Onderstepoort J Vet Res, 50, 3, 199-220, 1983. - 2. Borisov I., Pascalev M., Dinev I., Valchev I.: Mandibuloectomy as a method of treatment of mandibular canine tooth retention and secondary fibrous epulis in a dog. Veterinarski arhiv, 68, 2, 63 - 70, 1998. - 3. Cohen D., Reif J. S., Brodey R. S., Keiser H.: Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. Cancer Res, 34, 11, 2859-2868, 1974. - 4. Gardner D. G.: Epulides in the dog: a review. J Oral Pathol. Med., 25, 32-37, 1996. - 5. Gardner D. G.: Odontogenic tumors in animals, with emphasis on dogs and cats. In: Proceeding of the 11th EVD Congress, Granada, 17 - 26, 2002. - 6. Harvey C. E., Shofer F. S., Laster L.: Association of age and body weight with periodontal disease in North American dogs. J Vet Den, 11, 3, 94-105, 1994. - 7. Hoffmann T., Gaengler P.: Epidemiology of periodontal disease in poodles. J Small Anim Pract, 37, 7, 309-316, 1996. - 8. Lund E. M., Armstrong P. J., Kirk C. A., Kolar L. M., Klausner J. S.: Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. J Am Vet Med Assoc, 214, 9, 1336-1341, 1999. - 9. Reichart P. A., Philipsen H. P., Dur U. M.: Epulides in dogs. J Comp. Pathol., 106, 82 - 86, 1992. - 10. Sorensen U. P., Loe H., Ramfjord S. P.: Periodontal disease in the beagle dog. A cross sectional clinical study. J Periodontal Res, 15, 4, 380-389, 1980. - 11. Tzvetkov Y.: Pathomorphological studies and some epizootological properties at the tumors in dog. PhD thesis, Central Laboratory of Biology and Game Diseases with Small Animal Clinics, Sofia, 94-99, 1998. - 12. Yoshida K., Yanai T., Iwasaki T., Sakai H., Ohta J., Kati S., Minami T., Lackner A. A., Masegi T.: Clinicopathological study of canine oral epulides. J Vet Med Sci 61, 8, 897-902, 1999. - 13. Verstraete F. M., Lighelm A. J., Weber A.: The histological nature of epulides in dogs. J Comp Pathol, 106, 169 - 182, 1992. - 14. Dinev I., Borisov I., Bakalov D.: Incidence of canine neoplasms - retrospective histopathological studies. IV. Oropharyngeal tumors. Bulg J of Vet Med /in press/, 2003. - 15. Zhelev V., Dzhurov A., Angelov A.: Investigations about incidence and localisation of the tumours in the domestic animals and birds. Scientific works of the Higher Institute of Veterinary Medicine, XVI, 67-77, 1966.

SRPSKI

UČESTALOST EPULIDA KOD PASA – RETROSPEKTIVNA HISTOPATOLOŠKA ISPITIVANJA

I. Dinev, I. Borissov, D. Dimov

Retrospektivna histopatološka ispitivanja urađena su na 468 uzoraka materijala tumora dobijenih od pasa, predatih Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Trakiji, Stara Zagora, u perioda od 1991 do 2000, i dobijeni rezultati su ukazali na epulide u 29 uzoraka (6,19%).

Prema svojoj histogenezi, lezije su podeljene u dve osnovne grupe : reaktivne lezije – 37,94%, i periferni odontogeni tumori – 62,06 posto. Epulide su najčešće ustanovljene kod mužjaka (68,96%) u poređenju sa ženkama (31,04%). Prosečna starost zaraženih pasa bila je 4 godine, za oba pola. U 18 slučajeva (62,06%), lezije su bile na mandibuli, dok su u 11 slučajeva (37,94%) one bile na maksili. Najjača sklonost ka epulidama uočena je kod nemačkih ovčara – 27,58 posto.

Ključne reči: psi, epulide, učestalost

РУССКИЙ

ЧАСТОТА ЭПУЛИДОВ У СОБАК – РЕТРОСПЕКТИВНЫЕ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

И. Динев, И. Бориссов, Д. Димов

Ретроспективные гистопатологические исследования сделаны на 468 образчиков материала опухолей, полученных из собак, переданных Факультету ветеринарной медицины Университета в Тракии, Стара Загора, в периоде от 1991-2000, и полученные результаты показали эпюлиды в 29 образчиков (6,19%).

Согласно своему гистогенезу, повреждения разделены в две основные группы: реактивные повреждения – 37,94%, и периферические одонтогенные опухоли – 62,06%. Эпюлиды чаще всего установлены у самцов (68,96%) в сравнении с самками (31,04%). Средняя старость заражённых собак была 4 года для оба пола. В 18 случаев (62,06%), повреждения были на мандибуле, пока в 11 случаев (37,94%) они были на максиле. Самая сильная склонность к эпюлидам замечена у немецких овчарок – 27,58%.

Ключевые слова: собаки, эпюлиды, частота

**INFEKTIVNI PERITONITIS MAČAKA (FIP) U NAŠEM
SEKCIONOM MATERIJALU******FELINE INFECTIOUS PERITONITIS (FIP) IN OUR SECTION
MATERIAL*****Sanja Aleksić-Kovačević, D. Marinković****

Infektivni peritonitis mačaka (FIP) dijagnostikovao je u našem sekcijom materijalu kod 23 mačke, 19 persijskih i 4 domaće, oba pola, uzrasta između 5 meseci i 8 godina. Većinu inficirane populacije činile su životinje mlađe od 20 meseci. Makroskopski nalaz bio je kod većine mačaka granulomatoznog karaktera, a kod 7 životinja uočena je veća količina zlatno-žutog želatinoznog eksudata u trbušnoj duplji, što odgovara eksudativnoj formi FIP-a. Granulomi su bili smešteni u većini slučajeva u zidu abdomena, jetri, slezini, omentumu i serozni creva, a histološka građa odlikovala se fibrinoidno-nekrotičnim centrima, sa mnogobrojnim limfocitima, monocitima, angioblastima i fibroblastima. Imunohistohemijski, antigeni corona-virusa mačaka (FCV) ekspimirani su u citoplazmi makrofaga, ređe u plazmi ćelijama u granulomima, a ponekad i u nekrotizovanim oblastima.

Ključne reči: mačka, infektivni peritonitis mačaka (FIP), patohistologija

Uvod / Introduction

Infektivni peritonitis mačaka (FIP), uzrokovan je corona-virusom koji je veoma srodan virusu transmisivnog gastroenteritisa svinja, corona-virusu pasa i corona-virusu kod ljudi [7]. U novije vreme, FIP se sve češće dijagnostikuje u našem sekcijom materijalu, uglavnom kod persijskih i nešto ređe kod domaćih mačaka, oba pola [2]. Većinu inficirane populacije čine mačke mlađe od 20 meseci. Makroskopski i histopatološki nalaz kod spontanog i eksperimentalnog infektivnog peritonitisa do sada se opisivao u mnogobrojnim izveštajima u dve forme, eksudativnoj i proliferativnoj. Promene su, u oba slučaja, uglavnom lokaliz-

* Rad primljen za štampu 25. 2. 2004. godine

** Dr Sanja Aleksić-Kovačević, docent, mr Darko Marinković, asistent, Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

zovane u trbušnoj duplji, mada nije redak nalaz granuloma i na pleuri. U eksudativnoj formi dominira nalaz zlatno-žutog eksudata sa naslagama fibrina na peritoneumu, dok u proliferativnoj formi granulome najčešće nalazimo na serozi creva, u jetri, omentumu i slezini. Histološka građa granuloma bojenih hematoksilin-eozinom, uglavnom je prepoznatljiva, mada se imunohistohemijskim metodama precizno potvrđuje prisustvo i lokalizacija virusnih antigena (FCV) [5].

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Makroskopskim i mikroskopskim analizama obuhvaćeni su organi 23 mačke, oba pola, uzrasta od 5 meseci do 8 godina. U materijalu obdukovanom na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu nalazilo se 19 persijskih i 4 domaće mačke. Kod svih životinja, na osnovu patoanatomskog nalaza, a u nekim slučajevima i na osnovu prethodnih seroloških ispitivanja, postavljena je sumnja na infektivni peritonitis.

Uzorci jetre, slezine, bubrega, mezenterijalnih limfnih čvorova, mezenterijuma i pluća, fiksirani su u 10% neutralnom formalinu, a posle uobičajene automatske procedure napravljeni su parafinski blokovi. Isečci debljine 5 mikrometara bojeni su hematoksilin-eozinom (HE). U slučajevima u kojima prethodno nije urađeno serološko dokazivanje antitela na korona-virusne antigene (FCV), tkivni isečci su ispitani imunohistohemijskom metodom peroksidaza-anti-peroksidaza (PAP).

Serološka identifikacija antitela na FCV antigene, urađena je prethodno na uzorcima krvi, komercijalnim kit testovima. U imunohistohemijskim metodama upotrebljena su anti-korona-virus antitela (FCV3-70), proizvedena na mišu. U cilju otkrivanja virusnih antigena maskiranih zbog fiksiranja u formalinu, tkiva su prethodno tretirana komercijalnim rastvorom za demaskiranje antigena. Inkubacija isečaka normalnim serumom pacova služila je kao negativna kontrola.

Rezultati ispitivanja / *Results*

U našem sekcionom materijalu, infektivni peritonitis mačaka (FIP) dijagnostikovao je kod 23 životinje, u uzrastu između 5 meseci i 8 godina. Većina pozitivnih mačaka bile su mlađe od 20 meseci. Pozitivna reakcija na FCV dokazana je kod 19 persijskih i 4 domaće mačke, odnosno kod 13 ženki i 10 mužjaka. Prateći klinički izveštaji bili su različiti, mada je u većini slučajeva FIP bio suspektan, i na obdukciji često praćen i drugim nalazima. U većini slučajeva je zapažen na obdukciji fibrinozni i / ili granulomatozni peritonitis (slika 1).

Kod 7 mačaka trbušna duplja je bila ispunjena zlatno-žutim pihtijastim eksudatom, što odgovara eksudativnoj formi bolesti (slika 2).



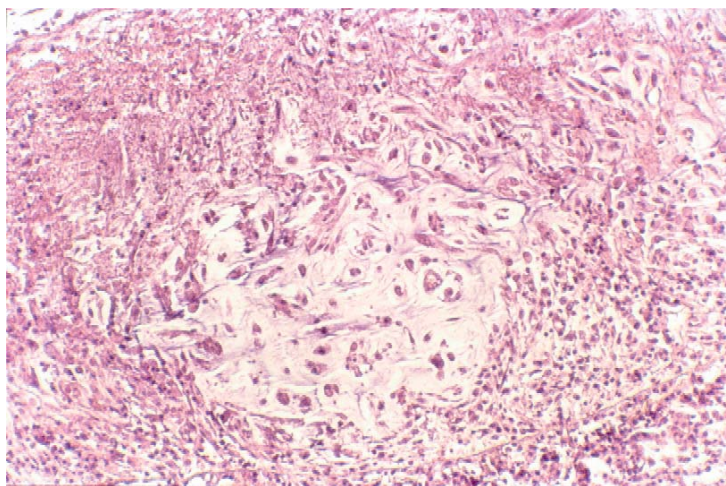
Slika 1. Granulomatозна forma FIP-a /
Figure 1. Granulomatous form of FIP



Slika 2. Eksudativna forma FIP-a /
Figure 2. Exudative of FIP

Kod ostalih, zapaženi su granulomi veličine 1 do 2 mm smešteni u abdominalnom zidu, omentumu i serozi creva, ređe u jetri, bubrezima i slezini. Neke životinje imale su enteritis, nekrotični limfadenitis mezenterijalnih limfnih čvorova i hiperplaziju slezine, a kod dve mačke dijagnostikovao je fibrinozno-granulomatozni pleuritis.

Patohistološki izgled granuloma u zidu abdomena, jetri, slezini, omentumu, serozi creva i bubrezima nije se suštinski razlikovao. Granulomi su bili građeni od fibinoidno-nekrotičnog centra, okruženog uglavnom limfocitima i monocitima, umnoženim angioblastima i fibroblastima (slika 3).



Slika 3. Histološka građa granuloma kod FIP-a, HE /
Figure 3. Histological structure of granuloma in FIP-a, He

U slezini i mezenterijalnim limfnim čvorovima dominirao je nalaz folikularne hiperplazije, mada su neki limfni čvorovi bili nekrotizovani.

Imunohistohemijskom metodom PAP, *corona*-virusni antigeni dokazani su u citoplazmi makrofaga i ređe u nekrotičnim oblastima. Granulomi u jetri sadržavali su pozitivne plazma ćelije koje su ekspimirale manju količinu FCV antigena. Negativne kontrole nisu pokazivale pozitivnu reakciju.

Diskusija / Discussion

U ispitanom materijalu FIP je dijagnostikovao kod 23 mačke, oba pola, u većini slučajeva kod sasvim mladih životinja, a dominantno kod persijskih mačaka, što je slično nalazima kod drugih autora [12]. Proliferativna forma praćena nalazom granuloma na serozama različitih organa, a pretežno lokalizovanih u abdomenu predstavljala je najčešći nalaz kod FIP pozitivnih mačaka u našem sekcionom materijalu. Granulomi su najčešće bili smešteni na serozu creva, mezenterijumu, u jetri, omentumu i slezini, a u nekoliko slučajeva i subpleuralno. Distribucija i histološka struktura granuloma, koja se uglavnom odlikuje fibrinoidno-nekrotičnim centrom, limfocitno-monocitnim infiltratom, angioblastima i fibroblastima, u skladu je sa opisima drugih autora [5, 11]. Kod životinja sa eksudativnom formom FIP-a, pored velike količine zlatno-žutog eksudata želatinozne konzistencije, smeštenog u trbušnoj duplji, u nekim slučajevima se opisani sadržaj nalazi i u perikardu.

Iako je makroskopski i histološki nalaz kod većine FIP pozitivnih mačaka tipičan, u nekim slučajevima kombinovan je sa dominantnim promenama na bubrezima i jetri koje ne mogu da se dovedu u direktnu vezu sa FIP-om [9]. Najčešće prateće nalaze predstavljale su promene na bubrezima u vidu policističnih bubrega (PKD), a kod istih životinja nisu bile retke promene u jetri, sa morfološkim znacima limfocitnog holangitisa i bilijarne ciroze, koje su do sada opisivane kod pasa i mačaka [3].

Uz ovo, istovremena infekcija korona virusima (FCV) i retrovirusima (FeLV), kod mačaka, opisana je u velikom broju radova [1, 6, 10]. Koinfekcija FIP i FeLV, zapažena je kod nekoliko životinja, u ispitanoj populaciji i to kod mačaka sa izraženim enteritisima i promenama na mezenterijalnim limfnim čvorovima.

Otuda, imunohistohemijska identifikacija FCV antigena predstavlja specifičan dokaz infektivnog peritonitisa mačaka.

Činjenica da su ovi antigeni ekspimirani uglavnom u makrofagama, indikator je virusne replikacije u ovim ćelijama. Takođe perivaskularni i perigranulomski infiltrati sastavljeni od B limfocita i plazma ćelija, kao i pozitivna reakcija u B limfocitima i plazma ćelijama u eksudatu, upućuju na FIPV specifični imunski odgovor koji se razvija i pre nego što granulomi postanu morfološki prepoznatljivi [8].

Rad je finansiralo MNTR kroz projekat 1659

Literatura / References

1. Aleksić-Kovačević Sanja: Retrovirusne infekcije mačaka, Monografija, Minax Beograd, 1999. - 2. Aleksić-Kovačević Sanja, Jelesijević T.: Feline infectious peritonitis (FIP) – the first cases diagnosed on our section material. *Archive of Oncology*. 9 (suppl.1), 69-70, 2001. - 3. Day M. J.: Immunohistochemical characterization of lesions of feline progressive lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *J Comp Pathol*. 119, 2, 135-147, Aug 1998. - 4. Hoskins J. D.: Coronavirus infection in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 23, 1, 1-16, 1993. - 5. Kipar Anja, Bellmann S., Kremendahl J., Kohler K., Reinacher M.: Cellular composition and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 65, 243-257, 1998. - 6. Kipar Anja, Kremendahl J., Gvant C.K., Reinacher M.: Expression of Viral Proteins in Feline Leukemia Virus – associated Enteritis. *Vet Pathol*. 37, 2, 129-136, 2000. - 7. McArdle F., Bennet M., Gaskell R.M., Tennant B., Kellz D.F., Gaskell C.J.: Introduction and enhancement of feline infectious peritonitis by canine coronavirus. *Am J Vet Res*. 53, 9, 1500-1506, 1992. - 8. Paltrinieri S., Ponti W., Comazzi S., Giordano A., Poli G.: Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol*. 96, 3-4, 141-148, 2003. - 9. Reinacher M.: Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Vet Immunol Immunopathol*. 21, 85-89, 1989. - 10. Soma T., Ishii H.: Detection of feline coronavirus antibody, feline immunodeficiency virus antibody, and feline leukemia virus antigen in ascites from cats with effusive feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci*. 66, 1, 89-90, 2004. - 11. Sparkes A. H., Gruffydd-Jones T. J., Harbour D. A.: Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assesment of their diagnostic velue. *Vet Rec*. 129, 10, 209-212, 1991. - 12. Tammer R., Evensen O., Lutz H., Reinacher M.: Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. 49, 177-182, 1995. - 13. Walter J.L., Rudolph R.: Investigations regarding the frequency and pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Dtch tierarztl Wschr*. 96, 194-201, 1989.

ENGLISH

FELINE INFECTIOUS PERITONITIS (FIP) IN OUR SECTION MATERIAL

Sanja Aleksić-Kovačević, D. Marinković

Feline infectious peritonitis (FIP) has been diagnosed in our section material in 23 cats, 19 Persian and 4 domestic, of both sexes, aged between 5 months and 8 years. The majority of the infected population were animals under 20 months of age. The macroscopic finding in most cats was of granulomatous character, and large quantities of golden-yellow gelatinous exudate were observed in the stomach cavity of 7 animals, corresponding to the exudative form of FIP. Granulomas were in most cases located in the abdomen wall, liver, spleen, omentum and serous membrane of intestines, and the histological structure was characterized by fibrinoid-necrotic centers, with numerous lymphocytes, monocytes, angioblasts and fibroblasts. Immunohistochemically, feline corona virus (FCV) antigens were exprimed in the cytoplasm of macrophages, more rarely in plasma cells in granulomas, and sometimes in necrotized areas.

Key words: cat, feline infectious peritonitis (FIP), pathohistology

ИНФЕКЦИОННЫЙ ПЕРИТОНИТ КОШЕК (ИПК) В НАШЕМ СЕКЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ

Саня Алексич-Ковачевич, Д. Маринкович

Инфекционный перитонит кошек (ИПК) диагностирован в нашем секционном материале у 23 кошек, 19 персидских и 4 домашних, оба пола, старости среди 5 месяцев и 8 лет. Большинство инфицированной популяции составляют животные моложе 20 месяцев. Макроскопические результаты были у большинства кошек грануломатозного характера, а у 7 животных замечено большее количество золотисто-жёлтого желатинозного экссудата в брюшной полости, что отвечает экссудативной форме ИПК. Грануломы были помещены в большинстве случаев в стенке живота, печени, селезёнке, оmentуме и серозе кишечника, а гистологический материал отличается фибриноидно-некротическими центрами, с численными лимфоцитами, моноцитами, ангиобластами и фибробластами. Иммуногистохимические, антигены коронавирусов кошек (КВК) экспримируются в цитоплазме макрофага, реже в плазма клетках в грануломах, а иногда и в некротизованных областях.

Ключевые слова: кошка, инфекционный перитонит кошек (ИПК), патогистология

**SEASONAL VARIATION OF THE PLEROCERCROID *LIGULA*
INTESTINALIS (L.) OBSERVED IN ROACH (*RUTILUS*
RUTILUS, L) FROM THE YENICE IRRIGATION POND,
ÇANAKKALE, TURKEY***

***PROMENE U PRISUSTVU PLEROCERKOIDA GLISTE *Ligula intestinalis*
(L) U ZAVISNOSTI OD GODIŠNJEG DOBA KOD CRVENPERKE (*Rutilus*
rutilus, L) IZ JENIS JEZERA ZA NAVODNJAVANJE KOD GRADA
ÇANAKKALE, TURSKA***

M. C. Oğuz, M. Oğuz Öztürk, H. Güre**

*This study was carried out at the Yenice Irrigation Pond between October 1999 and October 2000. For this study 368 roach (*Rutilus rutilus*) were examined and 37 parasites and 93 *Ligula intestinalis* were found in the abdominal cavity of the host (prevalence 10.1%, mean intensity 2.51 specimens/fish). Based on season, the highest number of infected fish occurred during summer (33.3%, 4 parasite/fish), and during the other season the mean intensity of infection was relatively low (prevalence 3.3%, 1 specimens/fish). On the other hand, the parasite species was determined especially on small and medium host fish sizes (2.17-100%). Basic criteria for the assessment of the parasite species of host fish were the general parameters related to parasite populations, which are prevalence, mean intensity, seasonal variation, and relationship between host size and infection.*

Key words: Plerocercoid, Ligula, seasonal variation, roach, Rutilus

Introduction / Uvod

It has been accepted among fisheries scientists world-wide that the plerocercoid of *ligula intestinalis* can cause major damage to cyprinid [9]. The

* Rad primljen za štampu 23. 1. 2004. godine

** M. Cemal Oğuz, Department of Biology, Faculty of Science and Art Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey; M. Oğuz Öztürk, Department of Biology, Faculty of Science and Art, Afyon Kocatepe University Afyon, E-mail address: oozturk@aku.edu.tr, Turkey; Hayati Güre, Fisheries Faculty, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

plerocercoids develop and mature in the body cavity of minnows, suckers and other fishes causing compression on gonadal tissue [8]. An important aspect of the damage caused by *Ligula intestinalis* to fish is its effect on reproduction. The size of gonads of even slightly infected fish is always smaller than in uninfected ones [2], limiting the reproductive capacity of the host.

The studied Yenice Irrigation Pond, contains numerous fish species including common carp, *Cyprinus carpio*; roach, *Rutilus rutilus* and *Barbus* species. It is of major economic importance to the area not only for the aquatic products and irrigation, but also of commercial importance since the fish represent a significant source of profit for the fishermen. This is one reason to select *Rutilus rutilus* for the present study due to its economic value and as it is a known host for *Ligula* sp. This study aims to enable us to grasp the parasite fauna of the fish, as well as the geographical properties of the lake. Naturally, it would be valuable to currently determine the parasite fauna of the fish for its future evaluations.

Material and methods / Materijal i metode rada

Yenice Irrigation Pond, situated near Çanakkale (39°, 27"-40°-42" N-25°, 40"-27°-30" E-consists of two peninsula). The Pond covers 3333 hectares (ha) and varies in depth to a maximum of 23 m. *Rutilus rutilus* were collected each month with 100 m. long gill-nets with 18-22 mm mesh. The nets were set in strategic places in the Yenice Irrigation Pond at sunset and removed at dawn. The fish specimens were placed in plastic aerated tanks filled with water from the Yenice Pond and transported immediately to the laboratory at Çanakkale University. Each fish was killed in a humane way, classified according to genus and species, and then weighed, measured and evaluated for state of health after which each was dissected by standards methods [12].

The plerocercoids for *Ligula* sp. were observed and collected primarily from the abdominal region of each fish. The plerocercoids were removed, washed and relaxed in cold water, and then fixed in 70% ethyl alcohol. The plerocercoids were stained and keyed to genus and species [3].

Results / Rezultati ispitivanja

Figure 1 correlates with water temperature (°C) and sampling dates. Figures 2 and 3 show a graphical representation of the fluctuation of infected fish during the 12-month time period and host fish size with the mean number of infected fish and numbers of plerocercoids per fish.

The parasite species, *L. intestinalis* infected the body cavity of host fish with a prevalence of 10.1% and mean intensity of 2.51 specimens/fish. Although noticed in all surveys, this species generally had a lower prevalence and mean intensity in infected fish (Fig. 2, 3). When seasonally viewed, it was ob-

served that the rate of infection increased steadily from winter toward summer and autumn except spring. In line with this result, the maximum density of this parasite occurred in July, with 10 specimens per fish. During winter and autumn, the difference between mean number of parasites and the number of parasites collected from host fish was more dramatic than the rate of parasite infection. Toward the

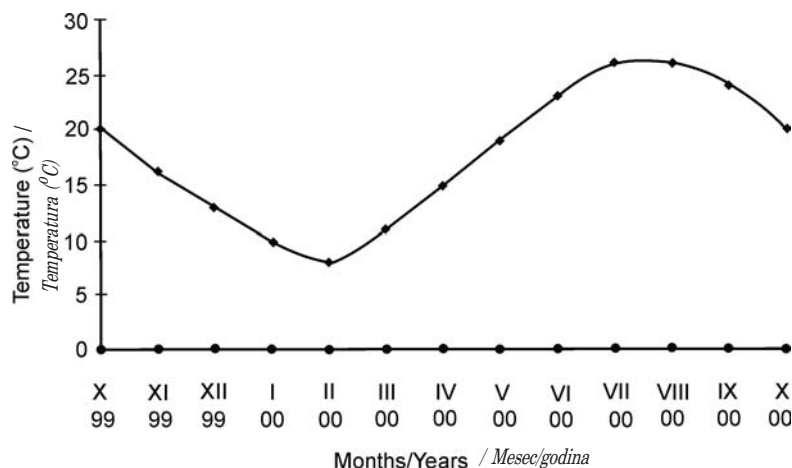


Figure 1. Water temperature of Yenice Irrigation Pond during the study period (surface) / Slika 1. Temperatura vode u Jenis jezeru za navodnjavanje u toku perioda istraživanja (površina)

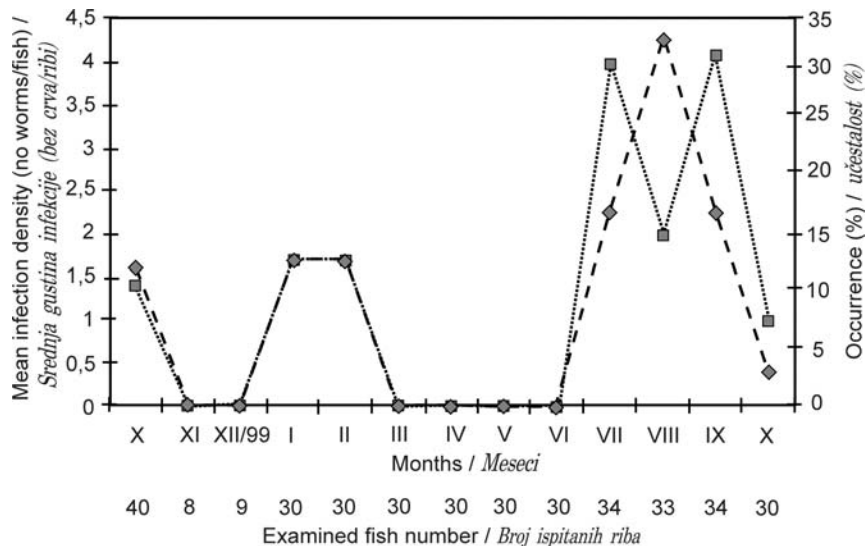


Figure 2. Occurrence (broken line) and mean density (solid line) of *L. intestinalis* in *R. rutilus* from Yenice Irrigation Pond over year /

Slika 2. Učestalost (isprekidana linija) i srednja gustina (puna linija) za *L. intestinalis* kod *R. rutilus* iz Jenis jezera za navodnjavanje u odnosu na veličinu i grupe riba

end of autumn, however, the infection rate starts to decline, and parasites disappear in spring (Fig. 2).

If the relationship between the intensity of infection by the parasite and the size of the host fish is assessed, it is evident that the parasite occurred more on smaller fish than on larger ones (Fig. 3). On the other hand, the highest mean intensity (3.6 parasites) was recorded on medium fish samples (except the last group). And then, as the fish became larger, infection by the parasite decreased steadily, and infection never occurred in fish larger than 13 cm. However, both infection and mean intensity per fish peaked on the biggest fish sampled (100%, 10 specimens one fish) (Fig. 3).

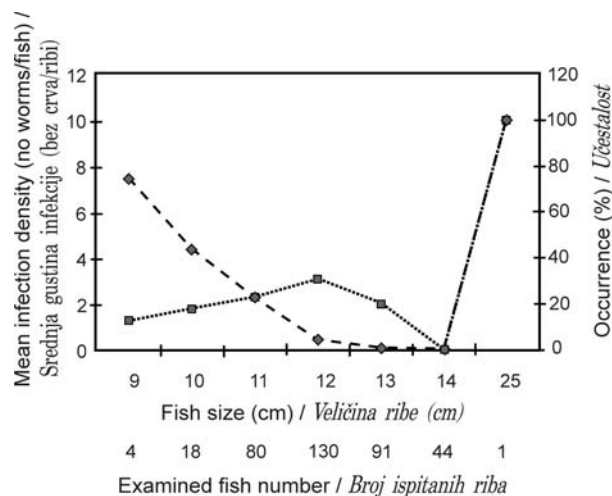


Figure 3. Occurrence (broken line) and mean density (solid line) of *L. intestinalis* for *R. rutilus* from Yenice Irrigation Pond in relation to size and groups of fish /

Slika 3. Učestalost (isprekidana linija) i srednja gustina (puna linija) za *L. intestinalis* kod *R. rutilus* iz Jenis jezera za navodnjavanje u odnosu na veličinu i grupe riba

Discussion / Diskusija

The primary objective of the present study was not only to study the prevalence of *Ligula intestinalis* in roach but to note the seasonal variation in the number of infected fish and parasite load. Figure 2, 3 represent results of the study showing numbers and the number of plerocercoids per infected fish. For this research, the average fish size for ligulosis infection was 11.5 cm (Fig. 1). It was discovered by a number of researchers that there was a significant relation between the number of *Ligula* infections and the size of the fish. They attribute the existence of *Ligula* infections in varying numbers to the content and amount of the host food. In the present study as well, fish infected with *Ligula intestinalis* were identified on small and medium size host fish during summer and autumn. In a

similar vein, Marcogliese & Esch [11] pointed out that the intensity of infection by the present species increased in May-June, decreased in August-September, and again increased in September-October. Likewise, Dence [5] reported that the rate of infection by *Ligula* had a decreasing trend on age 3+ *A. brama*. Hartley [7] found that the number of *Ligula* in young fish was high due to the fact that the copepods were the main part of the fish's diet. He also found that the low infection level in old fish varies in parallel with the decrease in their feeding on copepods. Dubinina [6] states that the other factor effecting the growth of *Ligula* is the quality of water and points out that hot, rough and shallow waters are the most favorable medium for *Ligula*.

On the other hand, *Ligula* had a considerable pathogenic effect on host fish. Cantoray and Özcan [4], recorded the occurrence of a high infection rate by *Ligula* on *L. cephalus*, *C. capoeta* and *B. plebejus* in Lake Cip and the dam Lake of Keban. Moreover, Taylor & Hoole [13] reported that, in *Ligula*-infected fish, some organs such as gonads and liver are deformed by shrinking. It is known that, as indicated by Bauer [1], death of *Ligula*-infected host fish is not beyond possibility, it may occur. Kosheva [10] stressed the *Ligula* can cause a decrease in the growth rate of freshwater fish in Russia, and that it may even cause serious damage and mortalities. Hartley [7] who carried out a similar study attributes the reasons for high ligulosis infection is high in freshwater fish to the fact that copepods are a major part of the host diet, thus the infection in older fish is low due to their feeding preference. Similarly, in the present study, the parasite can cause damage to the host fish specimens especially by compression and atrophy of vital organs including the gonads in the coelomic cavity of the infected fish. Also, there occurs a thinning of the tissue of the body cavity. Stomachs were swollen and the surface of the liver was reddish. The necropsy of fish, found dead on the study site, showed that infection with *Ligula* was seriously high, suggesting that mortality of fish could be attributed to this parasite.

As a result, the data of the present study emphasize the world-wide distribution of *L. intestinalis* and the effect of plerocercoid on fish in Turkey. It is beyond the scope of this paper to postulate on how useful parasites may be in the future, in helping understand the fish and fisheries in the study area. These are the first results published on the possible hosts and parasite effects on a seasonal basis for the ichthyofauna in the present study area.

I would like to thank to Dr Scott L. Gardner who is Curator of the Parasitology Division of The Harold Manter Laboratory, University of Nebraska, State Museum, as well as Dr Skip Sterner, Ms Ina Van der Veen and Mr Agustin Francisco Himenes (MSc) for their kind and constructive help during the evaluation of my study. /

Želim da se zahvalim dr Skot Gardneru, rukovodiocu Odeljenja za parazitologiju Laboratorije Harold Manter Univerziteta u Nebraski, Državni muzej, kao i dr Skip Sterneru, Ini Van der Venovoj i gospodinu Agustinu Francisku Himenesu (magistar nauka), za ljubaznu i konstruktivnu pomoć u toku procene mojih istraživanja.

References / Literatura

1. Bauer O. N.: Parasites of freshwater fish and the biological basins for their control, Israel Program Scientific Translations, Jerusalem, 1965. - 2. Brylinski E.: Wplyw tasiemca *Ligula intestinalis* (L.) na plodnose i rozrod leszeza- Abramis brama. Roczn. Nauk. Rolniczych Warszawa, Ser. H, 94, 7-16, 1973. - 3. Bychowskaya-Pavlovskaya I. E.: [Key to parasites of freshwater fish of the USSR.] Moskva-Leningrad: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSR. (In Russian: English Trans. Israel Program for scientific Translation) Cat. No. 1136, Jerusalem, 1962. - 4. Cantoray R., Özcan A.: Elazığ ve çevresindeki tatlısu balıklarında ligulose. Firat Univ. Vet. Fak. Dergisi, 2, 298-301 (in Turkish), 1975. - 5. Dence W. A.: Studies on *Ligula* infected common shiners (*Northern cormorant*, *Fontinalis agassizii*) in the Adirondacks. Parasitology, 3, 334-338, 1957. - 6. Dubinina M. N.: Influence on the parasitic fauna of fish of their overwintering in the overwintering branches of the Volga delta. Parazitolog. Sborn. Zool. Inst. Akad. Nativ. S.S.R., 11, 61-97, 1964. - 7. Hartley P. H. T.: The natural history of some British freshwater fishes. Proc. Zool. Scot. London, 117, 129-206, 1947. - 8. Heckmann R. A., Beers S. N.: Organ compression and atrophy in host tissue due to plerocercoids of *Ligula* sp. Fish Health Newsletter/American Fisheries Society, 15, 5, 1987. - 9. Hoffman G. L.: Parasites of North American Freshwater Fishes. Cornell Univ. Press, New York, 1999. - 10. Kosheva A. F.: Influences of the parasites *Ligula intestinalis* and *Digamma interrupta* on their fish hosts. Zool. Zh., 35, 1629-1632, 1956. - 11. Macrogliose D. J., Esch G. W.: Alterations in seasonal dynamics of *B. acheilognathi* in a North Carolina cooling reservoir over a seven year period, J. of Parasitol. 75, 378-382, 1989. - 12. Stoskopf M. K.: Fish Medicine. W.B. Saunders. Philadelphia, PA USA, 1993. - 13. Taylor M., Hoole D.: *Ligula intestinalis* L. (Cestoda) an ultracultural study of the cellular response of roach fry, *Rutilus rutilus* L. to an unusual intramuscular infection. Journal of Fish Diseases 12, 523-528, 1989.

SRPSKI

PROMENE U PRISUSTVU PLEROCERKOIDA GLISTE *Ligula intestinalis* (L.) U ZAVISNOSTI OD GODIŠNJEG DOBA KOD CRVENPERKE (*Rutilus rutilus*, L.) IZ JENIS JEZERA ZA NAVODNJAVANJE KOD GRADA ÇANAKKALE, TURSKA

Kemal Oguz, Oguz Ozturk, Hajati Gure

Ispitivanja su obavljena kod Jena jezera za navodnjavanje između oktobra 1999. i oktobra 2000. godine. Ispitano je 368 crvenperki (*Rutilus rutilus*) i pronađeno je 37 parazita i 93 gliste *Ligula intestinalis* u trbušnoj duplji domaćina (zastupljenost 10,0%, srednji intenzitet 2,51 uzoraka/ribi). U zavisnosti od godišnjeg doba, najveći broj zaraženih riba pojavio se u toku leta (33,3%, 4 parazita/ribi), a tokom drugih godišnjih doba srednji intenzitet infekcije bio je relativno nizak (zastupljenost 3,3%, 1 uzorak/ribi). Sa druge strane, ove vrste parazita posebno su ustanovljene kod malih i srednjih riba domaćina (2,17-100%). Osnovni kriterijumi za procenu vrsta parazita kod riba domaćina bili su opšti parametri u vezi sa populacijama parazita, kao što su zastupljenost, srednji intenzitet, promene po godišnjim dobima, i odnos između veličine domaćina i infekcije.

Ključne reči: plerocerkoida, *Ligula*, godišnja doba, crvenperka, *Rutilus*

**ИЗМЕНЕНИЯ В ПРИСУТСТВИИ ПЛЕРОЦЕРКОИДОЗ ГЛИСТА *Ligula intestinalis* (L.)
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ ГОДА У КРАСНОПЕРКИ (*Rutilus rutilus*, L.) ИЗ
ЕНИС ОЗЕРА ДЛЯ ОРОШЕНИЯ У ГОРОДА КАНАКАЛЕ, ТУРЦИЯ**

Кемал Огуз, Огуз Озтурк, Хаяти Гуре

Испытания совершены у Енис озера для орошения среди октября 1999 и октября 2000 года. Испытано 368 красноперок (*Rutilus rutilus*) и изображено 37 паразитов и 93 глиста *Ligula intestinalis* в брюшной полости хозяина (представительность 10,0%, средняя интенсивность 2,51 образчика (рыбы). В зависимости от времени года, наибольшее число заражённых рыб появилось в течение лета (33,3%, 4 паразита / рыбы). С другой стороны, этот вид паразитов отдельно установлен у маленьких и средних рыб хозяина (2,17-100%). Основным критерий для оценки видов паразитов у рыб хозяина были общие параметры в связи с популяциями паразитов, как представительность, средняя интенсивность, изменения по временам года, и отношение среди величины хозяина и инфекции.

Ключевые слова: плероцеркоиды, *Ligula*, времена года, красноперка, *Rutilus*

COMPARISON OF SOME BLOOD PARAMETERS, SERUM VITAMIN E AND MINERAL CONCENTRATIONS OF ARABIAN AND ENGLISH THOROUGHBRED RACE HORSES****POREĐENJE NEKIH PARAMETARA U KRVI, SERUMSKIH KONCENTRACIJA VITAMINA E I MINERALA KOD ARAPSKIH I ENGLESKIH ČISTOKRVNIH TRKAČKIH KONJA*****T. Bilal, E. Ercag, G. Demirel, T. Bilal****

The aim of this study was to determine some blood parameters, serum vitamin E and mineral concentrations of Arabian and English thoroughbred racehorses fed the same diets. The diet was formulated to provide 2.31 Mcal DE/kg, and 10.96% crude protein. Total protein, lactate, calcium, phosphorus, potassium, copper, cobalt and zinc were determined in serum obtained from 40 Arabian and 40 English healthy racing thoroughbred horses aged 2-3. The copper, cobalt and zinc concentrations were determined by atomic absorption, vitamin E by HPLC and the other biochemical parameters by a spectrophotometer. Mean values were 6.77 and 6.86 g/dl for total protein, 1.88 and 2.16 mg/dl for lactate, 13.18 and 12.80 mg/dl for calcium, 4.35 and 4.39 mmol/l for phosphorus, 2.64 and 3.14 mmol/l for potassium, 129 and 166 µg/dl for copper, 36 and 44 µg/dl for cobalt and, 160 and 58 µg/dl for zinc in Arabian and English horses, respectively, and Mean serum vitamin E levels were 2.65 and 2.81 µg/ml, respectively. This study did not demonstrate a significant effect of breed on serum total protein, lactate, calcium, phosphorus, copper, cobalt and vitamin E. However, breed may have an effect on potassium and zinc concentration in Arabian and English thoroughbred racehorses ($p < 0.05$).

Keywords: Horse, vitamin E, serum, minerals, Arabian, English Thoroughbred

* Rad primljen za štampu 20. 2. 2003. godine

** Tarik Bilal, Istanbul University, Veterinary Faculty, Department of Internal Disease, Istanbul, Turkey; Erol Ercag, Istanbul University, Engineering Faculty, Department of Chemistry, Istanbul, Turkey; Gulcan Demirel, Tanay Bilal, Istanbul University, Veterinary Faculty, Department of Animal Nutrition, Istanbul, Turkey, E-mail address: tanbilal@istanbul.edu.tr

Introduction / Uvod

All minerals play crucial roles in the physiological response to exercise, in energy metabolism and in tissue conservation during an exercise period [14]. Racehorses have needs for minerals as well as other nutrients in order to perform their task. Copper is particularly interesting for orthopaedic diseases in young horses. Zinc is also involved as a co-factor in many enzyme systems [9].

In cattle [6] and sheep [23], breed differences in ability to store copper were reported. This difference attributed to multiple genes causing maternal difference in copper absorption, retention or both. Unfortunately, there is limited information on mineral concentrations in the serum concerning horse breeds fed same diets. Grace *et al.* [7] reported differences in tissue copper concentration in horses that could not be explained by variation in dietary content possibly being due to the breed factor. Obviously, there is a need to establish reference values related to the breed.

Biochemical values are related to diet, sex, environmental agents and age and these parameters are used in diagnosis of diseases and assess the nutritional status of horses [2]. The establishment of reference values for biochemical parameters concerning breed could also be useful to assess nutritional status of horses and diagnosis of diseases. In addition, the effect of dietary vitamin E on serum vitamin E level and breed differences will also be determined.

This paper presents results of some blood parameters and vitamin E and mineral element analysis of serum collected from Arabian and English horses fed same diets.

Materials and methods / Materijal i metode rada

Animals and Diets / Životinje i ishrana

Forty Arabian and forty English thoroughbred racehorses (age from 2 to 3 years with an average initial weight of 415 kg, range 400 to 430; SE= 0.91) were used in this study. The diet was formulated to meet nutrient requirement for racehorses [16] and consisted of 63% grass hay and 37% mixed grain concentrate. Sample of feeds were analysed for dry matter (DM) and organic matter (OM) [1], and nitrogen (Kjeltec 1035 analyser, Tecafor). The vitamin E content of the diet was 98.5 IU/kg DM. This level was around the NRC, recommendation [16]. Trace-mineralised salt (Equi-Choice, Wilson Enterprises, Disputanta, VA, Table 1) and water were available *ad libitum*. Housing and feeding were similar for all horses. Diet ingredients and analysed chemical composition of diet is presented in Table 1.

Table 1. *Diet ingredients and analysed chemical composition (concentrate + forage) / Tabela 1. Sastojci hrane i analizirani hemijski sastav (koncentrat + silaža)*

Formula, % as fed / Formula, procenat davanog	
Grass hay / <i>Seno</i>	63
Ground barley / <i>Mleveni ječam</i>	20
Ground corn / <i>Mleveni kukuruz</i>	10
Molasses / <i>Melasa</i>	5
Dicalciumphosphate / <i>Dikalcijumfosfat</i>	0.5
Salt / <i>So</i>	0.5
Vitamin Premix ² / <i>Premiks vitamina</i>	0.25
Ground limestone / <i>Stočna kreda</i>	0.75
Analysis, DM basis / Analiza na bazi SM	
DM, % / <i>SM, %</i>	88,4
DE, Mcal/kg / <i>DE, Mkal/kg</i>	2.31
CP, % / <i>CP, %</i>	10.96
Ca, % / <i>Ca, %</i>	0.65
P, % / <i>P, %</i>	0.62
Cu, mg/kg / <i>Cu, mg/kg</i>	5.54
Zn, mg/kg / <i>Zn, mg/kg</i>	27.95
Co, mg/kg / <i>Co, mg/kg</i>	0.11
Vit E, IU/kg / <i>Vit E, IU/kg</i>	98.5

¹ Trace-mineralised salt was provided free choice. It contained (%) Ca, 7-9; P, 8; Mg, 1; S, 1; Zn, 5; Fe, 3; Cu, 12; Mn, 1; Co, 0.02; Na, 13.65; Cl, 21.35; Se, 0.01 /

So sa mineralima u tragovima je davana u neograničenim količinama. Sadržavala je (%) Ca, 7-9; P, 8; Mg, 1; S, 1; Zn, 5; Fe, 3; Cu, 12; Mn, 1; Co, 0.02; Na, 13.65; Cl, 21.35; Se, 0.01

² The premix provided the following 1 kg of diet: vitamin A, 1,380,000 IU, vitamin D₃, 258,000 IU, vitamin E, 26,455 IU; riboflavin, 701 mg; niacin, 3,009 mg; folic acid, 66 mg; thiamine mononitrate, 1,521 mg; d-biotin, 42 mg; β-caroten, 3,527 mg. /

Premiks je obezbeđivao u 1 kg obroka: vitamina A, 1,380.000 IU; vitamina D₃, 258,000 IU; vitamina E, 26,455 IU; riboflavina, 701 mg; niacina, 3,009 mg; folne kiseline, 66 mg; tiamin mononitrata, 1,521 mg, d-biotina, 42 mg; beta-karotena, 3,527 mg

Sampling / Uzorkovanje

At the end of the 4-week trial period, blood was collected from the jugular vein into evacuated collection tubes at rest in the horsebox. The blood sample was centrifuged and serum was then withdrawn and stored at -20°C until analyses could be performed.

Analytical procedures / Analitička procedura

Total protein (total protein liquicolor), lactate (lactate-PAP-Merieux), calcium (calcium liquicolor), phosphorus (phosphorus liquirapid), and potassium (potassium liquirapid) analyses were performed using the commercial kits (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH).

Serum copper, cobalt and zinc analysis were done according to Elmer [4] using atomic absorption (model 2380, Perkin-Elmer Cooperation). Feed analyses of copper, cobalt and zinc were performed according to Osborn and Voogt [18].

Serum samples were analyzed for α -tocopherol using HPLC with a fluorescence detector according to the method of Hidioglou [15]. All samples were analyzed in duplicate.

Statistical analysis / Statistička analiza

Results are presented as means with their standard errors (Table 2). All data were compared by means of Student's t test by using SPSS [19] program.

Results / Rezultati ispitivanja

Mean serum concentrations of total protein, lactate, calcium, phosphorus, potassium, copper, cobalt, zinc and vitamin E are presented in Table 2. Total protein values were similar in both Arabian and English horses. Lactate concentrations were higher in English horses but the difference was not significant. Similarly, serum concentrations of calcium and phosphorus and vitamin E were not statistically different between two breeds.

Table 2. Plasma total protein, lactate, calcium, phosphate, potassium, copper, cobalt and zinc levels of Arabian and English thoroughbred horses /

Tabela 2. Plazma nivoi ukupnih proteina, laktata, kalcijuma, fosfata, kalijuma, bakra, kobalta i cinka kod arapskih i engleskih čistokrvnih konja

	Arabian / Arapski (n=40)	English / Engleski (n=40)
	X $\pm$ SE	X $\pm$ SE
Total protein / Ukupni proteini (g/l)	67.7 $\pm$ 1.60	68.6 $\pm$ 1.50
Lactate / laktat (mmol/l)	0.209 $\pm$ 0.109	0.239 $\pm$ 0.013
Calcium / kalcijum (mmol/l)	3.288 $\pm$ 0.095	3.194 $\pm$ 0.052
Phosphate / fosfat (mmol/l)	1.404 $\pm$ 0.005	1.417 $\pm$ 0.035
Potassium / kalijum (mmol/l)	2.64 $\pm$ 0.61	3.14 $\pm$ 0.75 ^a
Copper / bakar (μ mol/l)	2.030 $\pm$ 0.126	2.613 $\pm$ 0.220
Cobalt / kobalt (μ mol/l)	6.109 $\pm$ 0.509	7.467 $\pm$ 0.339
Zinc / cink (μ mol/l)	24.480 $\pm$ 0.459 ^a	8.874 $\pm$ 0.499
Vitamin E / Vitamin E (μ g/ml)	2.65 $\pm$ 0.72	2.81 $\pm$ 0.57

^a Values for each mineral with superscripts are different (p<0.001) /
Vrednosti za sve minerale sa indeksom su različite (p10,001)

Potassium concentrations of serum in two breeds were different and this difference was statistically significant (p<0.05). Mean values for potassium

were 2.64 and 3.14 mmol/l for Arabian and English horses, respectively. The mean copper and cobalt concentrations of serum from both breeds were not found to be significantly different whereas zinc concentrations of Arabian horses were higher than those for English horses. Mean values were 160 and 58 µg/dl for Arabian and English horses, respectively, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 2).

Discussion / Diskusija

All proteins and proteids in blood serum are called „total protein value”. Acute phase proteins can be affected by disease states such as acute inflammatory disease, burn, blood losses, trauma. It was reported that in the case of chronic inflammatory diseases, nephritic syndrome, chronic hepatopathy like liver cirrhosis, chronic enteropathy, malign tumour and dehydration this value could be changed [12]. In the study of Kraft [15] this value was reported between 55-75 g/l and 5.5-7.5 g/dl, respectively. Orsini and Divers [17] found the value between 5.2-7.9 g/dl. Harris [9] measured this value at 58.2 ± 3.4 g/l before the race, 71.8 ± 8.36 g/l at speed of 12 m/min and 70.3 ± 9.36 g/l at the end of the race. Tyler-McGowen et al. [21] divided horses into two groups. The first group was control and the other one was a highly training (exercised) group. They measured the total protein value at 1, 15 and 32 weeks and they found the values 68.0 ± 1.0 g/l and 63.0 ± 2.0 g/l and 69.0 ± 2.2 g/l in control group and 68.0 ± 0.8 g/l, 63 ± 1.2 and 67.0 ± 1.2 g/l in exercised group, respectively. Heigl [12] reported this value between 5.8-8.0 g/dl. Our results support any of these reports discussed above and proved those horses, which were used in this study, had no sign of pathological disorders and our results could also prove that breed might not have an effect on total protein value.

Serum lactate concentration increases depending on exercise and has an effect on race performance and during the exercise, as a result of glycolysis, broken down glucose glycogen into lactic acid; large quantities of energy can be supplied. If the oxygen supply of the body is not enough, two pyruvate ions, which are the last product of glycolytic reaction, and hydrogen ions are reacted to produce lactic acid [22]. According to our observations values related to breed in serum lactate concentrations were not reported previously and our results showed that breed might not have an effect on serum lactate concentrations. It might be useful to indicate here reported lactate concentrations previously; Kraft [15] reported a maximum lactate concentration in horses of 9 mg/dl (0.999 mmol/l), Orsini and Divers [17] between 10-16 mg/dl. Harris and Snow [10] indicated that arterial lactate concentration ranged between 0.1-2.4 mg/dl (0.208-0.266 mmol/l) venous lactate concentrations between 1.0-1.36 mg/dl (0.111-0.150 mmol/l). Evans and Lorraine [5] used two different methods in their work and they observed that blood lactate concentration between 1.5 ± 0 mmol/l and 11.3 ± 9.6 mmol/l, and

plasma lactate concentration was between 3.3 ± 1.7 mmol/l and 20.7 ± 6.6 mmol/l depending on effort in exercise band.

Calcium is a component of bone and teeth and also plays an important role in muscle contraction, coagulation, enzyme and cellular defence system and secretion of some hormones. Total calcium concentration was found between 8.0-13.6 mg/dl by Kraft [15]. This value was around 11.2-13.6 mg/dl in the study of Orsini and Divers [17]. Haclehner [8] reported that calcium concentration in horses was between 2.5-3.3 mmol/l (10.0-13.22 mg/dl). In our case, this value was around 13.18 ± 0.32 mg/dl (3.28 ± 0.08 mmol/l) in Arabian horses and 12.80 ± 0.21 mg/dl (3.19 ± 0.05 mmol/l) in English horses as in normal range and no breed difference was found in calcium concentration in serum.

Levels of phosphorus, which is a component of bone and teeth and involved in most of the reactions in the body as a source of energy and also the main component of nucleic acids, important as a buffer in blood and cell and the main element of enzyme and proteins, were between 2.5-4.5 mg/dl in horses in the study of Kraft [15], between 3.61-5.6 mg/dl in the study of Orsini and Divers [17]. Haclehner [8] reported that the value of phosphorus concentration ranged between 2.2-6.6 mg/dl (0.71-2.13 mmol/l) in 95% of the horses and he claimed those numbers need to be taken as reference numbers. Our results are similar with those of these researchers and as discussed previously, no reported values are available for horse breeds for phosphorus concentration in serum.

Potassium is the main element of intracellular fluid, and plays a role in providing membrane potential, regulation of acid-alkali balance and enzyme activation. The values reported by Kraft [15] were 2.5-4.5 mmol/l (9.77-17.59 mg/dl). Orsini and Divers [17] and Haclehner [8] reported the values 2.4-4.7 mmol/l (9.38-18.38 mg/dl) and 2.2-4.8 mmol/l (8.60-18.77 mg/dl), respectively. In the study of Harris and Snow [10] effects of excessive exercise were observed. During the exercise, plasma potassium concentration was relatively increased, and at the end of the exercise this value reached a peak. Potassium concentration in some horses was around 10 mmol/l. In another work by these authors [11] in warming period, potassium concentration returned to the normal range. In our work, potassium concentration in Arabian horses was 2.64 ± 0.61 mmol/l, and in English horses 3.14 ± 0.75 mmol/l. This difference was statistically significant ($p < 0.05$).

The results of the present study suggest that breed has no effect on serum vitamin E level since similar values were observed in both English and Arabian horses (Table 2).

After an examination of blood samples from Arabian and English horses it was found that Arabian horses had a higher mean value of zinc than English horses (Table 2). No significant breed-related difference was observed in plasma cobalt and copper levels (Table 2). Despite no data being available on breed differences in trace element content of the body or plasma of horses, some researchers attribute the differences in results to the genotype of horses. For ex-

ample, when draught cross Quarter horses or Quarter horse yearlings were fed diets containing 7.6 to 15.1 mg copper/kg DM, 22.5 to 52.7 mg manganese/kg DM and 25 to 52.2 zinc mg/kg DM [3], the increase of trace element intake caused no significant differences in copper, manganese and zinc concentrations in liver, kidney and plasma. Grace *et al.* [7] also concluded that the reported differences in the trace element content of the body between the various horse studies and their study with horses do not appear to be related to varying cobalt, manganese, iron and zinc intakes and could be explained by genotypic differences. However, genotypic differences reported in most cases and also in trace element concentrations. For example, Scottish Blackface ewes were less efficient in absorbing copper than Welsh Mountain ewes [23]. In our work, we did not observe differences in absorbing copper and cobalt in horses but differences were observed in absorbing zinc (Table 2), and therefore English horses had lower serum zinc concentration when both breeds are fed diets of identical zinc concentrations. On the other hand, Stark *et al.* [20] reported differences in zinc concentration between horses and they attributed this difference in zinc plasma levels to the location of housing. Our observations do not agree with this explanation since the same housing system and feed was used in our study.

We only tested some biochemical parameters, macro, and some trace elements and just one vitamin as far as possible. But, the results emphasize the need to establish reference values related to the breed for whole biochemical parameters and minerals.

Literatura / References

1. AOAC: Official methods of analysis, 15th edition, Association of Official Agricultural Chemist, Arlington, Virginia, USA, 1990. - 2. Asano R., Suzuki K., Otsuka T., Otsuka M., Sakurai H.: Concentrations of toxic metals and essential minerals in the mane hair of healthy racing horses and their relation to age. *J Vet Med Sci*, 64, 607-610, 2002. - 3. Cymbaluk N. F., Christensen D. A.: Copper, zinc and manganese concentrations in equine liver, kidney and plasma. *Can Vet J*, 27, 206-210, 1986. - 4. Elmer P.: Biochemistry, BC5, BC7. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer Cooperation, Norwalk, CT, 1982. - 5. Evans D. L., Lorraine C. G.: Accuracy of Accusport for measurement of lactate concentrations in equine blood and plasma. *Equine Vet J*, 28, 398-402, 1996. - 6. Gooneratne S. R., Bailey V. J., Symonds H. W., Christensen D. A.: Effect of dietary Cu, Mo and S levels on the bile and urine Cu excretion in 2 breeds of cattle. *Can J Anim Sci*, 67, 1188, 1987. - 7. Grace N. D., Pearce S. G., Firth E. C., Fennessy P. F.: Content and distribution of macro-and micro-elements in the body of pasture-fed young horses. *Aust Vet J*, 77, 172-176, 1999. - 8. Haelechner B.: Referenzbereiche in der Labordiagnostik beim Pferd. Ludwig-Maximilians Universität, München, Inaugural Dissertation, 42-98, 1993. - 9. Harris P.: Tied up with electrolytes-or not? In: *Advances in Equine nutrition*. Edited by J.D. Pagan. Nottingham University Press, 1998. - 10. Harris P., Snow D. H.: The effects of high intensity exercise on the plasma concentration of lactate, potassium and other electrolytes. *Equine Vet J*, 20, 109-113, 1988a. - 11. Harris P., Snow D. H.: Plasma potassium and lactate concentrations in Thoroughbred horses during exercise of varying intensity. *Equine Vet J*, 23, 220-225, 1988b. - 12. Heigl G. G.: Referenzbereiche in der Labordiagnostik beim Pferd. (Blutglucose, Gesamteiweiss, CK, AST, AP, LDH, α -HBDH, GGT, GLDH). Lud-

wig Maximilians Universität, München. Inaugural Dissertation, 45-68, 1993. - 13. Hidiroglou M.: Mammary transfer of vitamin E in dairy cows. *J Dairy Sci*, 172, 1067, 1989. - 14. Jackson G. S.: Trace minerals for the performance horse. In: *Advances in Equine Nutrition*. 1st ed. Nottingham University Press, 1998. - 15. Kraft H.: Klinische Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 230-231, 1989. - 16. NRC: Nutrient Requirements of Horses. 5th ed. National Academy Press, 1989. - 17. Orsini J. A., Divers T. J.: *Manual of Equine Emergency*. W. B. Saunders Comp. Philadelphia, London, Toronto, 678-680, 1998. - 18. Osborn D. R., Voogt P.: *The Analysis of Nutrient Foods*. Academic Press, New York, 1978. - 19. SPSS: SPSS for Windows. Version 10.0 SPSS Inc; Chicago, IL, 1999. - 20. Stark G., Schneider B., Gemeiner M.: Zinc and copper plasma levels in Icelandic horses with Culicoides hypersensitivity. *Equine Vet J*, 33, 506-509, 2001. - 21. Tyler-McGowan C. M., Golland L. C., Evans D. L., Hodgson D. R., Rose R. J.: Haematological and biochemical responses to training and over training. *Equine Vet J*, 30, 621-635, 1999. - 22. Williamson C. C., James E. A., James M. P., May C. D., Casey P. J.: Horse plasma lactate determinations: comparison of wet or dry chemistry methods and effect of storage. *Equine Vet J*, 28, 406-408, 1996. - 23. Woolliams J. A., Suttle N. F., Wiener G., Field A. C., Woolliams C.: The long-term accumulation and depletion of copper content. *J Agr Sci*, 100, 441-449, 1983.

SRPSKI

POREĐENJE NEKIH PARAMETARA U KRVI, SERUMSKIH KONCENTRACIJA VITAMINA E I MINERALA KOD ARAPSKIH I ENGLESKIH ČISTOKRVNIH TRKAČKIH KONJA

T. Bilal, E. Ercag, G. Demirel, T. Bilal

Cilj ovog rada bio je da se odrede neki parametri u krvi i serumske koncentracije vitamina E i minerala u arapskim i engleskim čistokrvnim trkačkim konjima hranjenim istom hranom. Ishrana je određena tako da obezbedi 2,31 Mcal DE/kg i 10,96% sirovih proteina. Ukupni proteini, laktat, kalcijum, fosfor, kalijum, bakar, kobalt i cink su određivani u serumu dobijenom iz 40 arapskih i 40 engleskih zdravih čistokrvnih trkačkih konja starih 2-3 godine. Koncentracije bakra, kobalta i cinka su određivane atomskom apsorpcijom, vitamin E putem HPLC, a ostali biohemijski parametri koristeći spektrofotometar. Srednje vrednosti bile su 6,77 i 6,86 g/dl za ukupne proteine, 1,88 i 2,16 mg/dl za laktat, 13,18 i 12,80 mg/dl za kalcijum, 4,35 i 4,39 mmol/l za fosfor, 2,64 i 3,14 mmol/l za kalijum, 129 i 166 µg/dl za bakar, 36 i 44 µg/dl za kobalt, i 160 i 58 µg/dl za cink kod arapskih i kod engleskih konja, a srednje vrednosti serumskih nivoa vitamina E bile su 2,65 i 2,81 µg/ml. Ova istraživanja nisu pokazala značajni uticaj rase na serumske vrednosti ukupnih proteina, laktata, kalcijuma, fosfora, bakra, kobalta i vitamina E. Međutim, rasa bi mogla da ima uticaja na koncentracije kalijuma i cinka kod arapskih i engleskih čistokrvnih trkačkih konja ($p < 0.05$).

Ključne reči: konj, vitamin E, serum, minerali, arapski, engleski čistokrvni trkački konji

СРАВНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ В КРОВИ, СЫВОРОТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ВИТАМИНА Е И МИНЕРАЛОВ В АРАБСКИХ И АНГЛИЙСКИХ ЧИСТОКРОВНЫХ БЕГОВЫХ ЛОШАДЕЙ

T. Bilal, E. Ercag, G. Demirel, T. Bilal

Цель этой работы была определить некоторые параметры в крови и сывороточной концентрации витамина Е и минералов в арабских и английских чистокровных беговых лошадей, кормленных таким же кормом. Кормление определено так, что обеспечить 2,31 Мкал ДЕ/кг и 10,96% сырых протеинов. Совокупные протеины, лактат, кальций, фосфор, калий, медь, кобальт и цинк определялись в сыворотке, полученной из 40 арабских и 40 английских здоровых чистокровных беговых лошадей им 2-3 года. Концентрации меди, кобальта и цинка определялись атомной абсорбцией, витамин Е путём ХПЛЦ, а остальные биохимические параметры, пользуясь спектрофотометр. Средние стоимости были, 6,77 и 6,86 г/дл для совокупных протеинов, 1,88 и 2,16 мг/дл для лактата, 13,18 и 12,80 мг/дл для кальция, 4,35 и 4,39 ммол/л для фосфора, 2,64 и 3,14 ммол/л для калия, 1,29 и 1,66 мг/дл для меди, 36 и 44 мг/дл для кобальта, и 160 и 58 мг/дл для цинка у арабских и у английских лошадей, а средние стоимости сывороточных уровней витамина Е были 2,65 и 2,81 мг/мл. Эти исследования не показали значительное влияние породы на сывороточные стоимости совокупных протеинов, лактата, кальция, фосфора, меди, кобальта и витамина Е. Между тем, порода бы могла иметь влияния на концентрации калия и цинка у арабских и английских чистокровных беговых лошадей ($p < 0.05$).

Ключевые слова: лошадь, витамин Е, сыворотка, минералы, арабский, английский, чистокровны беговы лошадей

**COMPARISON OF ENDOSCOPIC, ULTRASOUND AND
MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS IN DIAGNOSIS OF
REPRODUCTIVE DISORDERS IN MARES***
*UPOREĐIVANJE ENDOSKOPSKE, ULTRAZVUČNE I MIKROBIOLOŠKE
DIJAGNOSTIKE POREMEĆAJA U PLODNOSTI KOD KOBILA*

M. Kosec, J. Mrkun, I. Klobučar, V. Kadunc-Kos**

Endoscopic examinations were performed on 37 mares of different breeds. All examined mares had reproductive problems. During the examination, the following pathological changes were found: inflammation of endometrium in 19 cases (64.9%), uterus adhesions in 4 cases (10.8%), exudate in uterus lumen in 13 cases (32.4%), thin fibrin exudate in 8 cases (21.6%) and lymphatic cysts in 12 cases (32.4%). In one case adhesions in the cervical wall were found, and in one case there was hair encapsulated in the cervical mucus as a consequence of fetotomy. These changes were found in 2.7% of cases.

Key words: bacteriology, endoscopy, infertility, mare, ultrasound

Introduction / Uvod

Endoscopy of the uterus is one of the diagnostic methods used for diagnosis of fertility disorders in mares. Different terms for the method mentioned above can be found in literature: endoscopy [3], hysteroscopy [6, 7, 5], fibroscopy [4] and videoendoscopy [21]. Modern endoscopic equipment enables a precise examination of the uterus from its cervix to the uterine horns. The picture of the uterus cavity can be observed directly, it can be photographed or transferred to the screen by camera [2, 1] i.e. videoendoscopy. Following dilatation using physiological solution or gas (CO₂), changes in the endometrium can be identified such as endometrial cysts, adhesions, accumulated fluid, abscesses, neoplasia, scars (cicatrices), foreign bodies, changes in the colour of mucus (anemia,

* Rad primljen za štampu 19. 6. 2003. godine

** Dr M. Kosec, dr J. Mrkun, dr I. Klobučar, dr V. Kadunc-Kos, University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Clinic for Reproduction and Horses, Ljubljana, Slovenia

hyperemia), mild inflammatory changes, which cannot be identified by other diagnostic methods. The modern endoscopes permit site specific biopsy, aspiration of uterine content, curettage for bacteriological, cytological or histological examination and small surgical procedures [5, 9].

An endoscope can also be used for the treatment of the uterus (flushing of the uterus or application of drugs), as well as for surgical procedures on the endometrium such as removal of lymphatic cysts and neoplasms [8]. An endoscope can also be successfully used in the examination of the development of the fetus and placental membranes, as well as in early twin pregnancies of mares when we want to eliminate one embryo.

Materials and methods / Materijal i metode rada

The following endoscopic equipment was used for the endoscopic examination of the uterus:

Fibroscope (colonoscope) Olympus, type 301/I/M,
Insufflation unit Olympus, type A 4075-78,
Light source Olympus, type CLK-4,
Instruments Olympus, type FG-25 SX,
Video Printer Sony, type UP-1800 EPM,
Videocamera Storz, type 20211001.

In the present study 78 endoscopic examinations were performed. Out of 37 mares of different breeds and ages, 9 mares had reproductive problems, 16 mares did not remain pregnant during the season, and 12 mares were infertile for one year or more.

An endoscopic examination was performed in all mares beside the gynaecological examination (vaginal and rectal ultrasonographic examination) and next to diagnostic examinations (bacteriological, cytological). Before the examination mares should be restrained in stocks, the tail should be wrapped and the perineal area washed and disinfected.

Results and discussion / Rezultati i diskusija

In 8 mares (32%) the secretion from the uterus was determined by vaginal examination. In 18 mares (48.6%) accumulation of fluid in the uterus and in 12 mares (32.4%) endometrial cysts were determined by ultrasound examination. Out of 22 mares (59.6%), whose vaginal culture was found to be bacteriological positive, in 13 cases hemolytic *Streptococcus* spp., in 7 cases *Taylorella equigenitalis*, and in two cases *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocollica*, respectively, were isolated.

By the use of endoscopy, in all 37 examined mares one or more pathological changes in the uterus were determined. Uterine adhesion was identified in

4 (10.8%) of the examined mares. Colour changes of the endometrium were observed in 25 mares (67.6%) in 21 mares (64.9%) hyperemia as a consequence of inflammation was determined, and in 2 mares (5.4%) anemia in some parts of the endometrium was identified, resulting from previous injuries. In 13 mares (35.1%) an increased fluid accumulation with inflammatory products in the uterus was found. Lymphatic cysts were identified in 12 mares (32.4%). In 8 cases (21.6%), that had retained fetal membranes, thin fibrin exudate was found using endoscopic examination. In one case adhesions in the cervical wall were found, and in one case there was hair encapsulated in the cervical mucus as an outcome of fetotomy. These changes were identified in 2.7% of examined mares.

Table 1. Comparison of endoscopic, ultrasound and bacteriological results
Tabela 1. Usporedni rezultati endoskopske, ultrazvučne i bakteriološke dijagnostike

Changes in the uterus / <i>Promene na uterusu</i>	Endoscopy / <i>Endoskopske</i>	Ultrasound / <i>Ultrazvučne</i>	Bacteriology / <i>Bakteriološke</i>
Hyperamia / <i>Hiperemija</i>	21	18	10
Anemia / <i>Anemija</i>	2	–	–
Adhesions / <i>Adhezija</i>	4	–	–
Accumulated fluid or exudate / <i>Akumulirana tečnost ili eksudat</i>	13	11	8
Endometrial cysts / <i>Endometrijalne ciste</i>	12	12	–
Fibrin / <i>Fibrin</i>	8	6	4
Hair in the cervix / <i>Dlaka u cerviksu</i>	1	–	–

In addition to being a diagnostic tool, endoscopy can also be used for therapy of the uterus such as removing contents from the uterus, flushing of the uterus and application of drugs into the uterus. Endoscopic minor surgical interventions in the uterus (removal of cysts) can also be performed.

Due to poor prognosis based on the results of uterus examination using endoscopy in 7 mares infertility therapy was not performed; in 4 mares highly developed uterine adhesions were identified, in 2 mares cicatrices after damaged endometrium, and in 1 mare a great number of endometrial cysts was found. The remaining 30 mares were treated. In 10 mares the majority of endometrial cysts were surgically removed using endoscopic technique, and in 13 mares endometritis was treated. According to the data obtained so far, 18 mares became pregnant after treatment, 7 mares obviously did not remain pregnant, and for remaining 12 mares the results are not known yet.

Although the number of examinations by the use of endoscopy in the period of two years was not high, the changes established in our cases are similar to the results of other authors [7, 5, 4].

From the results of our examinations it can be concluded that the causes of infertility, unable to be determined by other methods, were diagnosed using endoscopy in 15 (40.5%) of the examined mares. A proper diagnosis using endoscopy as well as a more objective prognosis was achieved in 19 (51.4%) of the examined mares.

Zaključak / Conclusion

The endoscopic examination of the uterus was helpful in determining the cause of infertility in mares. It proved to be the most reliable method in comparison to ultrasound and microbiological examinations. Despite the findings mentioned above, we could conclude that practitioners should use all available tests and techniques and should not rely on only one. From our experience the endoscope proved to be a very useful instrument also for treatment and small surgical procedures i.e. flushing, removal of endometrial cysts, application of drugs, etc.

Literatura / References

1. Allen W. R., Bracher V.: Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in the pregnant mares. *Eq Vet J*, 24, 4, 285-291, 1992. - 2. Bracher V., Mathias S., Allen W. R.: Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Eq Vet J*, 24, 4, 279-284, 1992. - 3. LeBlanc M. M.: Endoscopy. In: McKinnon AO, Voss JL, editors *Equine reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 255 - 258, 1993. - 4. Matherec E. C. *et al.*: The use of fibreoptic techniques in clinical diagnosis and visual assessment of experimental intrauterine therapy in mares. *J. Reprod And Fertil Supp*, 27, 293-297, 1977. - 5. Rosier C.: Hysteroscopy and biopsy of the endometrium in the mare. Dissertation, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, 1973. - 6. Schallenberger-Pottiez U.: Zur hysteroscopy bei Stuten. Dissertation, München, 1976. - 7. Wilson G. L.: Hysteroscopic Examination of mares. *Vet Med and Small Anim Clinical*, 4, 568-678, 1983. - 8. Wilson G. L.: Diagnostic and therapeutic hysteroscopy for endometrial cysts in mare. *Vet Med*, 59-63, 1985. - 9. Wilson G. L.: Equine hysteroscopy: Equipment for diagnostic endoscopy and photography. *Vet Med*, 80, 76-88, 1985a.

ENGLISH

**UPOREĐIVANJE ENDOSKOPSKE, ULTRAZVUČNE I MIKROBIOLOŠKE
DIJAGNOSTIKE POREMEĆAJA U PLODNOSTI KOD KOBILA**

M. Kosec, J. Mrkun, I. Klobučar, V. Kadunc-Kos

Primenom videoendoskopije pregledali smo 37 kobila različitih pasmina i uzrasta. Sve pregledane kobile su imale poremećaje u plodnosti. Prilikom pregleda utvrdili smo patološke promene kao što su: upala sluznice materice u 19 slučajeva ili u 64,9%, adhezija materice u 4 slučaja ili u 10,8%, tečnost sa ugrušcima gnoja u šupljini materice u 13 slučajeva ili u 35,1%, tanke fibrinske naslage u 8 slučajeva ili u 21,6% i limfatične ciste u 12 slučajeva ili u 32,4% pregledanih kobila. U jednom slučaju utvrdili smo adhezije u zidu cerviksa, a u jednom slučaju dlake prirasle na sluznicu cerviksa, što je bila posledica fetotomije obavljene pre. Te promene su bile utvrđene u 2,7% pregledanih životinja.

Ključne reči: kobile, neplodnost, dijagnostika, mikrobiologija, endoskopija, ultrazvuk

РУССКИЙ

**СРАВНИВАНИЕ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЙ, УЛЬТРАЗВУКОВОЙ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОМЕХ В ПЛОДОВИТОСТИ
У КОБЫЛ**

М. Косец, Й. Мркун, И. Клобучар, В. Кадунц-Кос

Употреблением видеоэндоскопии мы осмотрели 37 кобыл различных пород и возраста. Все осмотренные кобылы имели помехи в плодовитости. При осмотрах мы установили следующие патологические изменения: воспаление слизистой оболочки матки в 19 примеров или в 64,9%, адгезию матки в 4 примера или в 10,8%, жидкость с сгустками гноя в полости матки в 13 примеров или 35,1%, тонкие фибриновые наслоения в 8 примеров или в 21,6% и лимфатической кисты в 12 примеров или 32,4% осмотренных кобыл. В одном случае мы установили адгезии в стенке цервикса, а в одном случае шерсть приросла на слизистую оболочку цервикса, что было последствием до выполненной фетотомии. Эти изменения были установлены в 2,7 % осмотренных животных.

Ключевые слова: кобыла, плодовитост, диагностика, микробиология, эндоскопия, ультразвук

MONITORING THE OCCURRENCE OF *PATENS FORAMEN OVALE* IN FATTENING SWINE BREEDS – CONTINUATION*

PRAČENJE POJAVE FORAMEN OVALE PATENS KOD JOŠ NEKIH RASA TOVNIH SVINJA

**L'. Bajan, F. Jenčík, A. Tesfaye, J. Jr. Buleca, A. Bugarsky,
J. Jr. Skalka, J. Ivičiak****

The occurrence of foramen ovale patens (FOP) was investigated in 96 hearts taken from the Slovak meat-type (SM), 38 hearts from Yorkshire (YO), 51 hearts from Slovak meat-type x Yorkshire (SM x YO), 43 hearts from Pietrain x Yorkshire (PN x YO) and 45 hearts from Pietrain x Slovak meat-type (PN x SM) breeds. The investigation was done at the Station for Research and Meat Quality Evaluation.

We determined the presence of FOP only in the hearts collected from SM in 7 cases, which is 13.7% of the occurrence, and in the PN x SM in 4 cases (11.2%). We did not observe any occurrence of FOP in the other investigated breeds. All of the investigated positive cases of FOP were in the male breeds of the SM. In the cross breeds of PN x SM two positive cases of FOP were found in both sexes.

As far as the size of the FOP is concerned, there have been documented 2 mm diameter in four cases and 3 mm in three cases in the SM breeds. On the other hand, in the PN x SM cross breeds, neither case had more than 2 mm in size.

After comparing these results with our previous work, we decided further to investigate the occurrence of these heart defects at the line level of each meat breed.

Key words: swine, fattening, foramen ovale patens, breed line

* Rad primljen za štampu 23. 1. 2004. godine

** L. Bajan, F. Jenčík, A. Tesfaye, J. Jr. Buleca, A. Bugarsky A., J. Jr. Skalka, J. Ivičiak, University of Veterinary Medicine, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic

Introduction / Uvod

When we speak about the heart morphology defect, FOP, it will be better to characterize it at three levels: constant occurrence in some pig breeds and its absence in other breeds, the decrease of the utility of the meat breeds and the correction of a hereditary transmitted defect by means of breed line improvement [4]. Jelínek [5] warned against the occurrence of this heart defect in Slovakia half a century ago. These characteristics have a negative impact on the economy of pork productions [6] and this was confirmed in other research results [3, 2, 1].

It is a pity that there has been no interest in this problem because no information source is available, even though the first warning work was published abroad [7].

In Slovakia, where this work has been done, only a few researchers focused on the question of FOP in the pig [6, 4].

From its prospective acute importance and being a topical problem which affects the health, production and economy, we devoted more time to this problem in meat breeds. We focused on the study of the transmission of this heart defect from breed to breed and the possibilities of decreasing or completely eliminating the occurrence of FOP from meat breed pigs.

Materials and methods / Materijal i metode rada

The investigation was done at the Station for Research and Meat Quality Evaluation, which has its own slaughtering house. We looked into the hearts to find the presence of FOP after collecting them from the slaughtered pigs based on the constant method [2]. At the same time we also examined the size of the openings in all positive cases.

All documents of the fattening procedure at the station were available.

Our investigation was done on the following breeds.

- Slovak meat-type (SM),
- Yorkshire (YO),
- Slovak meat-type x Yorkshire (SM x YO),
- Pietrain x Yorkshire (PN x YO),
- Pietrain x Slovak meat-type (PN x SM).

Results / Rezultati

The collected data of the results of the investigation are presentet in Table 1 and 2.

From the 96 examined pig hearts in the SM, 7 cases were positive (13.7% of the total investigated animals). All seven defects were only in the female breeds. There were not any positive cases in 38 investigated hearts of the YO breed, 51 hearts from the SM x YO, and 43 hearts from PN x YO, but 4 cases in 45

hearts from PN x SM breeds (11.2% of the total examined animals) were positive. The positive cases found were 2 in the female and 2 in the male (Table 1).

Table 1. *The occurrence of foramen ovale patens in the observed breeds of swine*
Tabela 1. *Pojava foramen ovale patens u posmatranim rasama svinja*

Breeds / Rasa	Total number of examined pigs / Ukupan broj ispitanih svinja	Number of ex- amined pigs according to sex / Broj ispitanih svinja u zavis- nosti od pola		Total number of positive cases / Ukupan broj pozitivnih slučajeva	% of positive cases of the total examined / Procenat pozitivnih svinja od ukupnog broja ispitivanih	Number of positive cases according to sex / Broj pozitivnih slučajeva u zavisnosti od pola	
		♂	♀			♂	♀
SM / slovačka mesnata	96	50	46	7	13.7	0	7
YO / jorkšir	38	20	18	0	0	0	0
Sm x YO / slovačka mesnata x jorkšir	51	25	26	0	0	0	0
PN x YO / pietren x jorkšir	43	20	23	0	0	0	0
PN x SM / pietren x slovačka mesnata	45	25	20	4	11.2	2	2

Table 2. *The size of foramen ovale patens in the observed breeds of swine* /
Tabela 2. *Veličina foramen ovale patens u posmatranim rasama svinja*

Breed / Rasa	Total amount of positive cases / Ukupan broj pozitivnih slučajeva	Size of the foramen / Veličina foramena			
		2 mm diameter / prečnik 2 mm		3 mm diameter / prečnik 3 mm	
		Amount / Broj	Percent %	Amount / Broj	percent %
SM / slovačka mesnata	7	4	57.1	3	42.9
YO / jorkšir	0	0	0	0	0
SM x YO / slovačka mesnata x jorkšir	0	0	0	0	0
PN x YO / pietren x jorkšir	0	0	0	0	0
PN x SM / pietren x slovačka mesnata	4	4	100	0	0

As far as the size of the openings are concerned (Table 2) in the SM, 4 cases from the seven positive ones were 2 mm in diameter (57.1%) and three cases were 3 mm (42.9%). In the cross breeds PN x SM all four positive cases were only 2 mm wide.

Discussion / Diskusija

Due to the lack of reference sources on this problem we are able to compare the obtained results with our previous works on the FOP in different meat breed pigs. The results obtained from newly examined breeds are presented only as information and are evaluated as base values for further investigations.

Comparing the occurrence of FOP in SM, which showed 13.7% positive in this work, while the positive occurrence in the data of previous work, was only 3.3% [1], it is easy to observe the big rise of this heart defect. It is interesting that all positive cases were found in male pigs only.

As far as YO breed is concerned, 2.7% occurrence of FOP [1] was registered in the previous work, but in this work all these breeds were negative.

The other breeds: SM x YO, PN x YO and PN x SM were not examined because there were no positive cases presented in the previous work [1] and this was confirmed in the work of Gabriš *et al.* [4], too. It is necessary to follow and observe the lines of the crossed breeds. This can be seen in the results of the cross breeds of PN x SM, where we found 2% occurrence of FOP with 2 mm in diameter. Here, each breed used to cross might play the role to transform this heart defect.

The topic of the occurrence of FOP in meat breed pigs cannot be closed, but, on the contrary, it needs deep and wide research mainly at the level of lines of the commonly used breeds.

References / Literatura

1. Bajan L', Buleca J., Duran A.: Foramen ovale patens ošípaných vo vzťahu k úžitkovosti šiestich rôznych plemien. Slov. vet. čas., 24, 6, 299-301, 1999. - 2. Bajan L', Duran A.: Vplyv foramen ovale patens na úžitkové vlastnosti ošípaných u plemena biela ušlachtíla a landras. Infovet, IV, 4, 41, 1997. - 3. Bajan L', Gabriš J.: The frequency of genes for foramen ovale patens – Station of Fatten and Slaughter Value, Spišské Vlachy. Vet. čas., 125-126, 1974. - 4. Gabriš J., Popesko P., Staník J., Bajan L': Výskum geneticky podmienených chorôb a väd hospodárskych zvierat. Záv. správa VÚ P-11-329-051-219, Košice, Vysoká škola veterinárska, 1975. - 5. Jelínek K.: Vyhodnotenie patologických nálezov pri prehliadke mäsa ošípaných na sanitárnom bitúnku vo Veľkých Bieliciach. Atestačná práca, 1962. - 6. Popesko P., Meszároš Š.: Foramen ovale patens u ošípaných a straty, ktoré vznikajú v súvislosti s jeho výskytom. Veterinárství, 18, 10, 472, 1968. - 7. Steger W.: Variabilitet und Missbildung im Schweineherzen. Anat. Anz., 63, 10/11, 145-164, 1927.

SRPSKI

PRAĆENJE POJAVE FORAMEN OVALE PATENS KOD JOŠ NEKIH RASA TOVNIH SVINJA

L'. Bajan, F. Jenčík, A. Tesfaye, J. Jr. Buleca, A. Bugarsky, J. Jr Skalka, J. Ivičiak

U stanici za istraživanje i procenu kvaliteta mesa ispitivali smo prisustvo *foramen ovale patens* kod pojedinih rasa tovnih svinja. Ispitano je 96 srca od rase svinja slovačka mesnata (SM), 38 srca rase svinja jorkšir (YO), 51 srce rase svinja slovačka mesnata x jorkšir (SM x YO), 43 srca rase pietren x jorkšir (PN x YO) i 45 srca svinja rase pietren x slovačka mesnata (PN x SM).

Foramen ovale patens smo otkrili samo kod rase svinja slovačka mesnata (SM) u 7 slučajeva, što predstavlja 13,7 posto i kod rase pietren x slovačka mesnata (PN x SM) u 4 slučaja (11,2 %).

Kod ostalih ispitanih rasa svinja, prisustvo *foramen ovale patens* nismo ustanovili. Svi pozitivni slučajevi rase svinja slovačka mesnata zabeleženi su kod muškog pola. Kod svinja rase pietren x slovačka mesnata dva pozitivna slučaja su bila kod muškog i dva kod ženskog pola.

Što se tiče veličine *foramen ovale patens*, kod rase svinja slovačka mesnata bila je u četiri slučaja 2 mm i u tri slučaja 3 mm. Kod rase svinja pietren x slovačka mesnata, ni u jednom slučaju prečnik nije bio veći od 2 milimetra.

Upoređujući ove postignute rezultate sa rezultatima naših ranijih ispitivanja, zaključili smo da je neophodno praćenje prisustva ove srčane mane na nivou linija pojedinih rasa tovnih svinja.

Ključne reči: svinje, tov, *foramen ovale patens*, rase, linija.

РУССКИЙ

СЛЕЖКА ЯВЛЕНИЯ FORAMEN OVALE PATENS У ЕЩЁ НЕКОТОРЫХ ПОРОД ОТКОРМОЧНЫХ СВИНЕЙ

L'. Bajan, F. Jenčík, A. Tesfaye, J. Jr. Buleca, A. Bugarsky, J. Jr Skalka, J. Ivičiak

На станции откорма и убойной стоимости мы испытывали присутствие *foramen ovale patens* у отдельных пород откормленных свиней. Было испытанных 96 сердец из породы Словацкая мясистая (CM), 38 сердец породы *Yorkshire* (YO), 51 сердца породы Словацкая мясистая (CM) x *Yorkshire* (YO), 51 сердца породы Словацкая мясистая x *Yorkshire* (CM x YO), 43 сердца породы *Pietrain* x *Yorkshire* (PN x YO) и 45 сердец свиней породы *Pietrain* x Словацкая мясистая (PN x CM).

Foramen ovale patens мы открыли только у породы Словацкая мясистая (CM) у 7 случаев, что представляет собой 13,7% и у породы *Pietrain* x Словацкая мясистая (PN x CM) у 4 случаев (11,2%).

У остальных испытанных пород, присутствие *foramen ovale patens* мы не записали. Все положительные случаи породы Словацкая мясистая были записаны у мужского пола. У породы *Pietrain* x Словацкая мясистая два положительных случая были у мужского и два у женского пола.

Что касается величины *foramen ovale patens*, у породы Словацкая мясистая была в четырёх случаях 2 мм и в трёх случаях 3 мм. У породы *Pietrain* х Словацкая мясистая, ни в одном случае диаметр не был больше 2 мм.

Сравнивая эти достигнутые результаты с результатами наших более ранних испытаний, мы сделали вывод, что необходима слежка присутствия этого сердечного порока на уровне линий отдельных откормочных свиней.

Ключевые слова: свиньи, откорм, *foramen ovale patens*, породы, линия

NEKI POKAZATELJI KVALITETA MESA VINOGRADARSKOG
PUŽA (*Helix pomatia*)^{*}
*SOME QUALITY PARAMETERS OF LAND SNAIL MEAT (*Helix pomatia*)*

S. Tojagić, Ž. Kevrešan, Marija Jakanović^{**}

S obzirom na tradiciju sakupljanja vinogradarskog puža (*Helix pomatia*) sa naših prostora, radi izvoza, koja je „narušena” društvenim kontrolisanjem ovih aktivnosti, što bitno umanjuje mogućnost razvoja ove atraktivne delatnosti, u poslednje vreme se pokazala velika zainteresovanost ka formiranju prostora – farmi, za uzgoj i tov ove životinje. Iz tih razloga nametnula se potreba sistematičnosti u ispitivanju mogućnosti razvoja ove delatnosti u dužem vremenskom periodu i na širim prostorima. Početak istraživanja, istina samo sa aspekta nutritivnih i zdravstveno bezbednih pokazatelja kvaliteta jestivog dela, rezultirao je podacima prikazanim u ovom radu. Praćeni su osnovni hemijski sastav i sadržaj nekih elemenata i organohlorinih insekticida kao neminovnost ljudskom življenju i okruženju.

Ključne reči: meso vinogradarskog puža, osnovni hemijski sastav, elementi, organohlorini insekticidi

Uvod / Introduction

Meso vinogradarskog puža (*Helix pomatia*) od davnina se koristi u ljudskoj ishrani. Istina, više na prostorima izvan naše zemlje, mada se taj region od uvek smatrao kvalitetnim donatorom ove sirovine. Kako se izlovljavanje radi otkupa i plasmana, iz poznatih razloga, sve više stavlja pod kontrolu, mnogobrojni su pokušaji da se ova životinja, uslovno rečeno, uzgaja u uslovima farme. U novije vreme sve je više pokušaja ovakvog načina proizvodnje. Pogotovo zato što se permanentno otvaraju mogućnosti izvoza. U ekspanzionom periodu formiranja farmi za uzgoj ne biraju se načini pribavljanja priplodnih jedinki. Uglavnom se to obavlja izlovljavanjem i sakupljanjem iz regiona bliskih novoformljenom prostoru za uzgoj i tov. To ponekad mogu da budu i prostori blizu naseljenih, pa i kon-

* Rad primljen za štampu 5. 12. 2003. godine

** Dr Slobodan Tojagić, Žarko Kevrešan, Marija Jakanović, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

taminisanih mesta. Stoga je potrebno da se permanentno obavljaju ispitivanja osnovnog hemijskog kvaliteta i eventualnog sadržaja kontaminenata mesa puža, kao i nejestivih delova koji mogu da se upotrebljavaju za ishranu stoke.

Kako se prema dostupnim podacima meso vinogradarskog puža ne razlikuje bitno od kvaliteta mesa stoke za klanje, a u odnosu na masu žive jedinke kreće se u količini od 42 do 30 posto [1, 9], što verovatno zavisi od velikog broja uzroka, ipak je vredno pažnje da se ispitivanja obavljaju permanentno.

Ovim radom su obuhvaćena ispitivanja obavljena na mesu jedinki vinogradarskog puža sakupljenih iz užeg regiona Novog Sada, preciznije iz okruženja nove industrijske zone, odnosno prostora u krugu fabrike „Novkabel”.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Za ispitivanja koristili su se uzorci odmah posle sakupljanja i prispeća u laboratoriju. Odvajanje stopala, odnosno jestivog dela obavljeno je mehanički, odsecanjem posle toplotne obrade u kipućoj vodi u trajanju od 3 minuta. Dobijeni uzorci su zamrznuti u uslovima zamrzivača koji se koristi i u domaćinstvima. Pre ispitivanja uzorci su se vadili i odmrzavali na sobnoj temperaturi (18-20°C tokom 15 časova).

Tako dobijeni uzorci mehanički su usitnjeni i homogenizovani na uobičajen način, posle čega su određeni osnovni pokazatelji kvaliteta.

U laboratorijskim uslovima su obavljena ispitivanja osnovnog hemijskog sastava određivanjem sadržaja:

- suve materije – sušenjem pri 105°C do konstantne mase (JUS ISO 1442, 1998),
- pepela – žarenjem do konstantne mase (JUS ISO 936, 1999),
- ukupnih proteina – modifikovanom metodom po Kjeldahlu (JUS ISO 937, 1992),
- masti – metodom po Soxhletu (JUS ISO 1444, 1998),
- glikogena (Rede, Rahelić, 1975).

Za određivanje sadržaja metala uzorak je pripreman metodom suvog spaljivanja [2], posle čega su očitavanja obavljena na instrumentu Varian SpectrAA 10.

S obzirom da su uzorci sakupljeni nasumce, bez kontrole prostora na kome su nađeni, obavljeno je i ispitivanje sadržaja organohlornih insekticida [2].

Rezultati i diskusija / *Results and discussion*

Podaci iz literature o osnovnom hemijskom sastavu mesa vinogradarskog puža koji potiče sa naših, prostora relativno su oskudni, pa se, s obzirom na dosadašnju praksu sakupljanja iz prirode radi izvoza i nagle i veoma velike ekspanzije interesa za uzgojem ove životinje u kontrolisanim uslovima, nameće

potreba sistematskog pristupa i praćenja podataka u dužem vremenskom periodu i na većim prostranstvima.

Rezultati prikazani u ovom radu samo su jedan mali, tek početni deo sistematskog pristupa istraživačkom radu u ovoj oblasti.

U tabeli 1 prikazani su dobijeni rezultati ispitivanja osnovnog hemijskog sastava mesa vinogradarskog puža:

Tabela 1. Osnovni hemijski sastav
Table 1. Basic chemical composition

Sadržaj, % / Content, %				
Suva materija / <i>Dry matter</i>	Mast / <i>Fat</i>	Proteini / <i>Proteins</i>	Pepeo / <i>Ash</i>	Glikogen / <i>Glycogen</i>
16,52	0,38	11,88	1,14	2,86

Dobijeni rezultati znatno se razlikuju, odnosno sadržaj proteina i masti je znatno niži nego što pokazuju dostupni podaci iz literature (sadržaj proteina 11,88 posto prema 16,30 posto, sadržaj masti, 38 posto prema 0,38 posto). Objašnjenje je verovatno u činjenici da su uzorci sakupljeni u periodu godine (kraj maja, početak juna) kada je životinja još „izmorena” zimskim preživljavanjem, a i činjenicom da je prostor odabran nasumice, bez dodatnih količina hrane.

Tabela 2. Sadržaj nekih elemenata
Table 2. Contents of certain elements

Element / <i>Element</i>	Ca	Mg	Fe	Cu	Pb	Cd	As
mg/100g	230,89	40,72	1,28	15,99	0,006	0,027	0,002

Prema podacima dobijenim istraživanjima objavljenim u ovom radu prikazanim u tabeli 2 sadržaj nekih elemenata u mesu vinogradarskog puža kreće se u granicama dozvoljenog za ovu vrstu sirovine. Na osnovu ovoga može da se pretpostavi da i u bližem okruženju većih gradskih naselja nema relevantne opasnosti uticaja negativnih ekoloških faktora na kvalitet.

Takođe, praćenjem sadržaja organohlorinih insekticida u mesu vinogradarskog puža došlo se do podataka da u ovom slučaju, odnosno sakupljanjem u prirodnim uslovima i okruženju gradske sredine nije bilo negativnih uticaja (tabela 3).

Tabela 3. Sadržaj organohlorinih insekticida
Table 3. Content of organochlorine insecticides

Organohlorini insekticid / <i>Organochlorine insecticide</i>	Sadržaj mg/kg / <i>Content mg/kg</i>
Alfa HCH / <i>Alpha HCH</i>	nn
Beta HCH / <i>Beta HCH</i>	nn
Lindan / <i>Lindane</i>	nn
Heptahlor / <i>Hepatachlorine</i>	nn
Aldrin / <i>Aldrin</i>	nn
Heptahlor epoksid / <i>Heptachlorien epoxide</i>	nn
Endosulfan I / <i>Endosulphane I</i>	nn
Dieldrin / <i>Dieldrine</i>	nn
4,4 DDE	nn
Endosulfan II / <i>Endosulphane II</i>	nn
4,4 DDD	nn
Endosulfan sulfat / <i>Endosulphane sulphate</i>	nn
4,4 DDT	nn
Endrin aldehyd / <i>Endrine aldehyde</i>	nn

nn – nije nađeno, odnosno sadržaj je ispod granice detekcije /
nn – not found, content below detection level

Zaključak / Conclusion

Istraživanja, kao početna faza dugoročnijeg rada na ovom problemu ukazala su u slučajevima osnovnog hemijskog sastava znatna odstupanja od podataka prikazanih u dostupnoj literaturi. Sigurno je da bi im se u uslovima intenzivnog uzgoja i tova ove vrednosti znatno približile, a moguće da bi bile i više.

Isto tako, rezultati ispitivanja sadržaja nekih elemenata i organohlorinih insekticida potvrdili su činjenicu da blizina relativno velikih ljudskih naselja nije bitno uticala na kvalitet potencijalne sirovine za dalju preradu, odnosno zdravstvenu bezbednost po ljudski organizam.

Literatura / References

1. Čaklovica F.: Veterinaria, 40, 1-2, 151, 1991. - 2. FAO: Manuals of food quality control. 2 Additives, contaminants, techniques. FAO food and nutrition paper 14/2, Rome, 1980. - 3. JUS ISO 1442: Određivanje sadržaja vlage. Savezni zavod za standardizaciju, 1998. - 4. JUS ISO 1444: Određivanje sadržaja slobodne masti. Savezni zavod za standardizaciju, 1998. - 5. JUS ISO 936: Određivanje ukupnog pepela. Savezni zavod za stan-

dardizaciju, 1999. - 6. JUS ISO 937: Određivanje sadržaja azota. Savezni zavod za standardizaciju, 1992. - 7. Poleksić V.: Gajenje puževa. Nolit, Beograd, 2003. - 8. Rede R., Rahelić S.: Priručnik za laboratorijske vežbe iz tehnologije mesa, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1975. - 9. Ristić M., Sakač Marijana, Kormanjoš Š., Filipović S.: Tehnologija mesa, 41, 4-6, 163-167, 2000. - 10. Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu: Tablica sastava namirnica, Beograd, 1964. - 11. Tojagić S., Mirilov M.: Hrana – značaj i tokovi u organizmu, Matica Srpska, Novi Sad, 1998. - 12. Vraneš Z., Minić B.: Farne puževa. Ekonomski biro, Beograd, 1984.

ENGLISH

SOME QUALITY PARAMETERS OF LAND SNAIL MEAT (*Helix pomatia*)

S. Tojagić, Ž. Kevrešan, M. Jkanović

Considering the tradition in our regions to collect land snails (*Helix pomatia*) for export, which is „disrupted” by social control resulting in limited possibilities to develop this attractive activity, there is a great interest lately for land snail breeding and fattening at farms. For this reason it is necessary to investigate systematically the possibilities to develop this activity in a longer period and in larger areas. The first investigations, although covering only nutritive and health safety aspects of the edible parts yielded the results presented in this work. Chemical composition, the content of some elements and organochlorine insecticides were followed as unavoidable in human living and environment.

Key words: land snail meat, chemical composition, elements, organochlorine insecticides

РУССКИЙ

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЯСА ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ (*Helix pomatia*)

С. Тоягич, Ж. Кеврешан, Мария Ёканович

Учитывая на традицию собирания виноградной улитки (*Helix pomatia*) с наших просторов ради вывоза, нарушенная общественным контролированием этих активностей, что существенно уменьшает возможность развития этой аттрактивной деятельности, в последнее время показался большой интерес к формированию простора - ферм, для выращивания и откорма этого животного. На этих основаниях навязалась нужда систематичности в испытании возможности развития этой деятельности в более долгом периоде и на более широких просторах. Начало исследования, правда только в аспекте питательных и здравоохранительно безопасных показателей качества съедобной части являлось результатом данными, показанными в этой работе. Слежен основной химический состав и содержание некоторых элементов и органохлористых инсектицидов как неминуемость людскому бытию и окружению.

Ключевые слова: мясо, виноградной улитки, основной химический состав, элементы, органохлористые инсектициды

**NEPLODNOST PRIPLODNOG BIKA U TEHNOLOGIJI
OSEMENJAVANJA***

***INFERTILITY OF THE BREEDING BULL IN INSEMINATION
TECHNOLOGY***

M. R. Predojević, M. Marinković, M. Jovičin, I. Prka**

I pored strogog izbora priplodnih bikova, posebno za program VO, njihova poremećena plodnost, neplodnost ipak je neminovnost u praksi. Ovo tim pre što je seme bika inače označeno kao razlog neuspjeha plodnosti krava u programu VO. Zbog toga seme može da bude i vektor širenja reproduktivnih specifičnih infekcija - IBR, IPV, BVD, Campylobacter-Vibrio fetus, Brucellosis, Tuberculosis, Leptospirosis i/ili nespecifične - miksinfekcije - C. pyogenes, Pseudomonas aureus, Streptococcus haemo., Staphylococcus pyogenes, Proteus spp., Mycoplasma, koje inače remete plodnost goveda.

Vitalnost - %, pokretljivost, kao i penetraciona moć, imunološka svojstva spermatozoida, takođe imaju veliku ulogu u neuspjehu oplodžavanja goveda.

Zbog toga je potrebna stalna stručna briga, zato što samo zdravi priplodni bikovi - VO centri omogućavaju sigurnu transmisiju genetskog unapređenja goveda, tj. proizvodnje mleka i mesa za sve brojniju populaciju ljudi u svetu.

Ključne reči: multipna etiopatogeneza, organska oboljenja, neplodnost bikova

Uvod / Introduction

Bez obzira na nivo složenosti građe organizama živoga sveta, njihova plodnost u razmnožavanju je biološka funkcija koja obezbeđuje produžavanje žive materije u vremenu i prostoru. Ako je tako a jeste, onda je jalovost poremećaj

* Rad primljen za štampu 26. 9. 2003. godine

** Dr Mirko R. Predojević, SVC, Beograd-Krnjača; dr Miroslav Marinković, SVC, Velika Plana; dr Milovan Jovičin, Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad; Igor Prka, SVC, Beograd, Krnjača

plodnosti domaćih životinja ozbiljan problem, koliko biološki (medicinski), toliko i ekonomski, posebno kod onih najkorisnijih životinja u gajenju – goveda.

U tehnologiji osemenjavanja goveda, ključni značaj svakako ima *sperma-seme* priplodnog bika. A plodnost, tj. oplodna moć bika je veoma osetljiv pokazatelj opšteg zdravlja, a može da bude poremećena idiopatskim oboljenjima, lociranim u bilo kom delu organizma koja kao posledicu uzrokuju simptomatske funkcionalne poremećaje (češće se odnosi na krave). Ali, ne treba zaobići ni ispitivanje reproduktivne sposobnosti priplodnog bika, posebno ne one koje su u programu osemenjavanja, budući da su ključne za uspeh osemenjavanja, odnosno oplođavanje krava. Najzad, i *neplodnost (jalovost)* ozbiljno usporava opšte genetsko poboljšanje populacije goveda.

Ispitivanje priplodnih bikova treba usmeriti ka njihovom opštem zdravlju i/ili pogodnosti za rasplodavanje – osemenjavanje. Pri tom treba da se koriste kriterijumi procene:

- **opšte zdravlje** („slobodni” od negenitalnih poremećaja koji bi uticali na opšte zdravlje i reproduktivne sposobnosti),
- **nasledni status** („slobodni” od naslednih mana predaka, progeni ili fenotipski za dotičnu životinju,
- **polno zdravlje** („slobodan” od genitalnih infekcija),
- **libido, sposobnost za priplod,**
- **oplodna sposobnost** (oplodna moć sperme u oplođavanju ženske jajne ćelije).

Etioopatogeneza / Etiopatogenesis

Reprodukcija je inače uslovljena većim brojem isprepletanih, često međusobno zavisnih činilaca, bilo organske ili objektivne prirode. Otuda je i sama *etioopatogeneza* poremećene plodnosti bikova svakako multipleksne prirode. Izazivana nizom činilaca, bilo tkivnih sistema ili ćelijskim (morfo-patoloških) oboljenjima u organizmu, remeteći tako normalne procese ili tokove reprodukcije, u našem slučaju, goveda.

Faktori poremećene plodnosti / Factors of fertility disorders

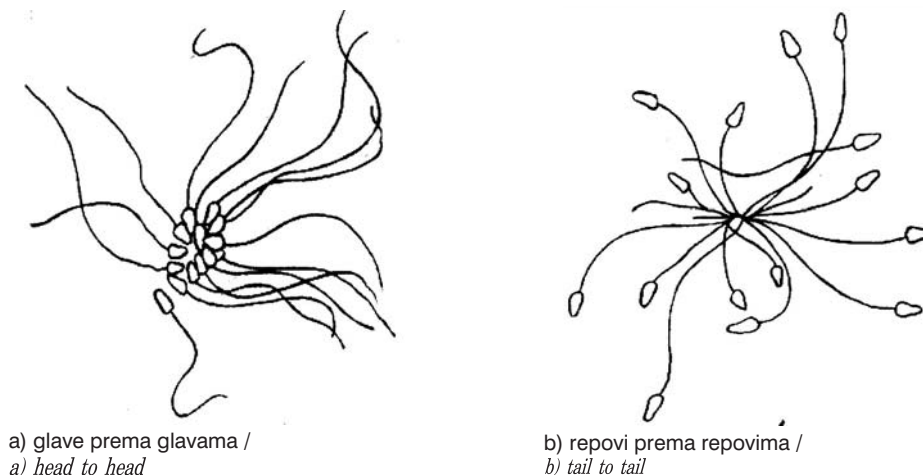
Kongenitalne/hromozomske aberacije (u pojedinim slučajevima)/ *Congenital chromosomal aberrations in specific cases*:

Pre svakog izbora priplodnih bikova obavezno je da se obrati pažnja na kongenitalne (malformacije) anomalije, pre svega, na skrotumu mladih bikova, i to: na asimetriju testisa (skrotuma), *hipoplaziju* testisa bilo da je ona (*uni* ili *bi*) lateralna, jer to svakako kasnije ima za posledicu poremećaje u rasplodavanju, odnosno na spermo-patološki profil priplodnog bika, čime se dotična mana prenosi na potomke. Pritom, svakako ne sme da se zaobiđe očigledan *kriptorhizam* koji se javlja kod svih domaćih životinja mužjaka, zbog čega se inače preporučuje hro-

mozomska analiza bilo krvi i/ili sperme odabranih mladih bikova za program osemenjavanja [5].

Zbog *hromozomske aberacije* važno je da se eliminišu oni priplodni bikovi opterećeni kariogramskim, ali i oni autosomalnim aberacijama, jer u oba slučaja one se prenose na potomke ili uzrokuju poremećaje plodnosti, tj. sterilitet u reprodukciji goveda [3, 6].

Naravno, pri odabiranju mladih bikova treba da se obrati pažnja na anomalije i devijacije u razvoju prepucijma (*phymosis*), pa i penisa, jer to postiže širenje najčešće nespecifičnih infekcija tokom njihovog korišćenja, naravno i putem osemenjavanja. Prisustvo antitela u serumu krvi bika (posledica proboja *barijere krv-testisa*), skoro redovno izaziva *aglutinaciju* i/ili *imobilizaciju spermatozoida*, što ima kao posledicu smanjenu plodnost kod osemenjenih krava [10]. IgM antitela (bilo lokalna – cervikalna sekrecija ili u cirkulaciji u krvi) snažno reaguju u zoni akrozoma ili repa spermatozoida, izazivajući aglutinacione rozete u formi, „glave naspram glave ili repa prema repu” [10].



Slika 1. Tipičan oblik aglutinacije spermatozoida
Figure 1. Typical form of agglutination of spermatozoa

Takođe i žumance u razređivaču sperme može da uzrokuje imunološke reakcije, što utiče na plodnost u osemenjavanju goveda [7]. Naravno, ova pojava se javlja u laboratorijskom ispitivanju, ali i u praksi veštačkog osemenjavanja – klinički.

Repro-fiziološki / Repro physiological

I repro-fiziološke smetnje mogu da čine ozbiljne probleme, posebno kod visoko-genetski priplodnih bikova. To se, pre svega, odnosi na **insuficijenciju libida** tokom korišćenja, odnosno njihovog izbora. Tim pre, jer je **libido** merilo njihove polne sposobnosti. Ukoliko polni prohtev mladog bika (*libido*) prilikom

njihovog odabiranja traje vremenski *nešto duže od 10 minuta*, onda je to znak njegovog slabog ispoljavanja libida. Inače, u proceni libida bika postoje ove gradacije; *odličan ako je <0.5 min; dobar ako je <5 min; ako je >10 minuta ne zadovoljava, odnosno veći (≥10 min) potpuno nezadovoljava*. Dakle, bikovi se isključuju iz daljeg korišćenja [13]. Odrasli bikovi ne bi trebalo da ispoljavaju sezonske ili periodične promene libida. Mada se i to u praksi dešava kod nekih priplodnih bikova tokom korišćenja.

Spermatološki / Spermatological

Naročita pažnja treba da se obrati na izlučenu spermu priplodnih bikova koja bi se koristila u programu za osemenjavanje i to, pre svega, na; *spermatološki i mikrobiološki (sanitarni) kvalitet*:

- a) bakteriološki,
- b) virusološki,
- c) parazitološki,
- d) imunološki.

Doza semena koja bi svakako uzrokovala poremećenu (smanjenu) plodnost krava u osemenjavanju svakako sadrži: povećan broj mrtvih (> 45%), odnosno smanjen broj (>) vitalnih (*pokretnih*) spermatozoida, bez obzira na umeće same inseminacije krava. Drugim rečima, uspeh osemenjavanja, tj. plodnost krava u mnogome zavisi od njenog spermatološkog, pa i sanitarnog kvaliteta doze semena.

Ali ne treba zanemarivati ni njen sanitarni sadržaj (profil doze sperme) koji može i te kako da utiče na smanjenu (o)plodnost, ukoliko sperma potiče od bikova inficiranih virusima (IBR/IPV/BVD), *Leptospirae*, *Campylobacter-Vibrio fetus*, [14, 1, 4] ali i onih obolelih od uslovno patogenih miks-bakterijska infekcija, (na primer, *vesiculitis et ampullitis seu adenitis*) [2, 8, 12].

Tabela 1. Zapaljenjski proces akcesornih polnih žlezda priplodnih bikova
Table 1. Inflammatory process in accessory sex glands of breeding bulls

Uzroci infekcije (mikroorganizmi) / Cause of infection (microorganisms)	Dijagnoza / Diagnoses (p. rectum / p. mortem)	Klinički simptomi / Clinical symptoms (hod/hromost / gait/limping / II. iliofemoralis)*	
<i>C. pyogenes</i>	<i>Vesiculitis duplex</i>	+	natečeni / swollen
<i>Pseudomonas aer.</i>	<i>Ampullitis duplex</i>	+	natečeni / swollen
<i>Streptococcus hemo.</i>	<i>Vesiculitis uni/bilat.</i>	±	natečeni / swollen
<i>Staphylococcus pyog.</i>	<i>Ampulitis uni/bilat.</i>	–	–
<i>Mycoplasma</i>	<i>Ampulitis uni/bilat</i>	+	–
<i>Proteus spp.</i>	<i>Vesiculitis – adenitis</i>	+	?

* primetan / opipljivi *per rectum*

* visible / palpable *per rectum*

Preventiva / Prevention

Selekcija u izboru mladih bikova, posebno za program osemenjavanja, pored osnovne namene, odabiranje po precima (proizvodno), konstitucijski, fenotipski, treba da ima *preventivnu* meru u izbegavanju kongenitalnih mana, polne hromozomske aberacije, ili autosomalnih. Inače, neposredno pred korišćenje bika u osemenjavanju, potrebno da se ispita valjanost sperme – vitalnost, kao i njena pogodnost za duboko zamrzavanje. Tokom odabiranja mladih bikova za program v.o. korišćenja, sasvim je opravdano praćenje epizootiološkog stanja i zdravstvene kontrole samih grla (tabela 2).

Tabela 2. Profilaksa i epizootiološki prikaz infektivnih oboljenja priplodnih bikova, pre i tokom korišćenja

Table 2. Prophylaxis and epizootiological presentation of infectious diseases in breeding bulls, before and during use

Laboratorijske pretrage uzoraka oboljenja (metode)* / Laboratory examinations of causes of disease (methods)*			
pre korišćenja / before use			tokom korišćenja / during use
U zapatu slobodni od / In breeding stock – free	u zapatu ili pre karantina (30 dana i pre) / in breeding stock or before quarantine (day 30 and earlier)	u karantinu (u toku 30 dana) / in quarantine (within 30 days)	periodično u korišćenju (2 x godišnje) / periodically in use (twice annually)
Tuberkuloza / Tuberculozes	tuberkuloza (tuberkulin test) / tuberculozes (tuberculin test)	bruceloza (serum- aglutinacija, RVK) / brucellosis (serum- agglutination, RVK)	tuberkuloza (tuberkulin test) / tuberculozes (tuberculin test)
Bruceloza / Brucellosis	bruceloza (serumaglutinacija, RVK) / brucellosis (serumagglutination, RVK)	IBR/IPV/IPB (serumneutralizacija, ELISA-test) / IBR/IPV/IPB (serumneutralization, ELISA-test)	bruceloza (serumaglutinacija) / brucellosis (serumagglutination,
IBR/IPV/IPB IBR/IPV/IPB	IBR/IPV/IPB (serumneutra- lizacija, ELISA-test) / IBR/IPV/IPB (serumneutrali- zation, ELISA-test)	leptospiroza (mikroaglutinacija) / leptospirosis (microagglutination)	EBL (agar-gel imuno- difuzija / ELISA-test) / EBL (agargel immunodi- fusion/ELISA-test)
EBL (serološki neg. imunodifuzija) fluorosensantitel. test / kulturelno / EBL (serologically neg. immunodiffusion) fluorosensantibody test / culture		Campylobacter fetus (serum neutralizacija / ELISA) / (serum neu- tralization / ELISA)	IBR/IPV/IPB (agar- imunodifuzija) / ELISA test / IBR/IPV/IPB (agar-immunodiffusion) / ELISA test
	BVD/MD (fluorosensanti- tel-test / imunoperoksida- sa-test) / BVD/MD (fluoro- sensantibody-test / imunoper- oxidase-test)	Trichomonas fetus (mikroskopski, kultu- relno iz vešt. vagine) / (microscopically, culture, from art. vagina)	leptospiroza (mikroa- glutacioni test) / leptospirosis (microagglutination test)
			Campylobacter fetus fluorosensantitel-test iz veštačke vagine / (fluorosensantibody- test/culture from art. vagina)

Tek posle ovih obavljenih testova i redovne kontrole, ukoliko se pokažu *dobri*, preстоji njihovo intenzivno iskorišćavanje u programu osemenjavanja.

Tokom njihovog korišćenja, ishrana priplodnih bikova ima odgovarajuću ulogu u proizvodnji sperme i oplodne sposobnosti. Svakako da se uticaj ishrane na plodnost više proučavaо kod krava, nego kod bikova u programu osemenjavanja. Međutim, zna se da pothranjenost u mladim bičičа koči razvoj njihovog polnog oubličavanja i proizvodnju sperme. Deficitarnost proteina više pogađa mlade bikove, nego starije [Braden *et al.*, 1974], pošto više utiče na odražavanje njihovog *libida*, nego na *optimalnu* proizvodnju sperme. Po svemu sudeći, deficitarnost u vitaminima (A, D, E), pa čak i nekih od vitamina B kompleksa, imaju važniju ulogu u oplodnoj moći i proizvodnju sperme bika. Što se tiče pomanjkanja minerala u ishrani priplodnih bikova, deficitarnost joda je uzrok njegovog *smanjenog libida i lošijeg kvaliteta sperme*. Dok dodaci hrani obogaćenih *bakrom, kobaltom, cinkom i magnezijumom* značajno poboljšavaju proizvodnju sperme, što redovno prati poboljšanje plodnosti goveda, u celini. Međutim, *fito-estrogeni* u kabaѕtoj hrani mogu da maju štetan uticaj na akcesorne polne žlezde ili kod krava koje su na paši mogu da utiču na cervikalnu sekreciju, pa time ometaju transportovanje spermatozoida u genitalnom traktu, odnosno na plodnost bika i krave [9].

Stajska higijena i higijena priplodnog bika / Stall hygiene and hygiene of breeding bull

Higijena priplodnog bika se podrazumeva, takođe i njegov smeštaj. Inače, higijena bika i te kako može da utiče na *sanitarni profil* doze semena. O tome već postoje međunarodna usvojena pravila o sanitarnom higijenskom kvalitetu doze semena za osemenjavanje krava. Dok, aljkava primena osemenjavanja samo može da doprinese lošem uspehu oplodjenja, pošto vlasnici krava stalno sumnjaju u ispravnost semena bika (tj. oplodnu sposobnost doze semena).

Zaključak / Conclusion

Ma koliko neplodnost krava privlači veću pažnju stručnjaka, neplodnost bika „*prosto*” ne zanima mnogo terenske veterinare. Oni, pa i vlasnici krava, s pravom očekuju kvalitetnu dozu semena (spermatološki i visoko genetski vrednu). Uostalom, to je obaveza svakog savrenenog centra. Dakle, *neplodnost priplodnih bikova*, to je već briga onih koji rade u Centru za reprodukciju goveda.

U ovom, stručno-revijalnom pregledu o *etiopatogenezi neplodnosti bika*, taksativno je izložena njena ukupna složenost koja je prisutna u praksi osemenjavanja, ne ulazeći pri tom posve detaljnije u nju. Već kao androlog specijalista ukazujem na njen *značaj i ulogu* koju može da ima za čitavu tehnologiju osemenjavanja goveda. Otuda se uloga bika u osemenjavanju smatra *ključnom*,

jer se od njega očekuje, pre svega, **plodnost i genetsko poboljšanje** u populaciji goveda koja se osemenjavaju.

I pored toga ostaju mnogobrojna pitanja i dileme.

Pre svega, zna li se sve o njenoj (spermi) oplodnoj moći, kao i kvalitetu. Šta pokretljivost spermatozoida zaista znači, oplodnu moć ili...? Da li je njihova pokretljivost u korelaciji sa oplodnjem? Zašto sperma *nekih bikova* ima različitu oplodnu moć? Neki bikovi imaju snažnu oplodnu moć, čak i pri razređenju 10×10^6 , dok drugi relativno nisku, a razređenju i od 20 do 25×10^6 , a obe su ocenjivane istom metodom. Da li mrtvi spermatozoidi u dozi semena utiču na plodnost i/ili embrionalnu smrt kod krava? **Da li zaista vlasnici krava dobijaju onaj kvalitet semena što im se kataloški nudi!?** Da li spermatološki kvalitet sperme odgovara stepenu plodnosti krava? I na kraju, da li se plodnost krava pouzdano evidentira u praksi *marvenih (veterinskih) lekara*.

Literatura / References

1. Bisping J. *et al.*: Das vorkommen der Campylobacteriosis genitalis bei Rindern in Norddeutschland an Hand von serologisch en Untersuchungen, 1981. - 2. Blom E.: Some experience in Connection with the Sanitary Laboratory Control of Semen Samples from A.I. Bulls. Danish-Polish Conference, Powlowce, Poland, 1973. - 3. Bongso A., Basrur P.: Chromosome anomalies in Canadian Guernsey bulls Cornell. Vet. 66, 476, 1976. - 4. Dedie K. *et al.*: Zur Verbreitung, Ermittlung und Beimpfung der venerischen Campylobacteriose beim Rind in ... Tierarztl. Umsch. 37, 80-96, 1982. - 5. Fechtmeier N. S.: A cytogenic survey of young bulls in the USA Vet. Rec. 93, 535, 1973. - 6. Galloway D.: Testicular hypoplasia and autosomal secondary constriction in bulls. 8th Inter. Congr. Reprod. and AI, IV, 710, 1976. - 7. Griffin J. *et al.*: An immuno response to egg-yolk sperm deluent in dairy cows J. Reprod. Fert., 25, 193, 1971. - 8. Hafez E. S. E.: In Reproduction in Farm Animals, 488 - 490, 1980. - 9. Mann T.: Effects of nutrition on male accessory organs; in Male Accessory Organs, New York Academic Press, 1974. - 10. Menge A.: Early embryo mortality in heifers isoimmunized with semen and conceptus J. Reprod. Fert., 18, 67, 1969. - 11. Menge A.: In Immunology, E.S.E Hafez (ed) New York, North Holland Publishing, 1976. - 12. Predojevic R. M. *et al.*: Vesiculitis (sadenitis) of the breeding bulls and its sperm quality, 9, 10, 245, 14th Inter. Cong. on Anim. Repro., Stockholm, 2000. - 13. Rosenberger G.: in Clinical Examination of Cattle, 309 - 311, 1979. - 14. Zemjanis R.: Vaccination for reproductive efficiency in cattle, J. Am. Vet. Med. Ass. 165, 689-693, 1974.

ENGLISH

BREEDING BULL INFERTILITY IN INSEMINATION TECHNOLOGY

M. R. Predojević, M. Marinković, M. Jovičin, I. Prka

In spite of very strict breeding bull selection, especially for A.I. programmes, *their infertility* is a very serious problem in everyday practice. Especially bull semen has been marked as the *main factor* for unsatisfied cow fertility in the A.I. programme. The reason could be the bull semen which really may play as the *spreading factor* of the specific or

non-specific reproductive infective disorders – IBR, IPV, BVD, *Campylobacter-Vibrio fetus*, brucellosis, leptospirosis, tuberculosis and other reproductive diseases.

Secondarily, the percentage of vitality, motility, penetration abilities, and immunological properties of bull spermatozoa also have an important role in unsuccessful bovine fecundation. That is, why it is necessary to secure professional health care for breeding bull in AI centres, because only healthy bulls can ensure good *bovine genetic transmission and progress* in cattle production for today's growing population.

Key words: multiple etiopathogenesis, organic diseases, bull infertility

РУССКИЙ

НЕПЛОДОВИТОСТЬ ПЛЕМЕННОГО БЫКА В ТЕХНОЛОГИИ ОСЕМЕНЕНИЯ

М. Предоевич, М. Маринкович, М. Йовичин, И. Прка

И возле строгого выбора племенных быков, отдельно для программы И.О., их нарушенная плодовитость, неплodовитость всё таки неминуемость в практике. Это тем прежде, что семя быка иначе обозначено как причина неуспешной плодovитости коров в программе И.О. Вследствие щтого оно-семя может быть и вектор расширения репродуктивных специфических инфекций – ИБВ, ИПВ, БВД, *Campylobacter-vibrio fetus*, *brucellosis*, *tuberculosis*, *leptospirosis* и-или неспецифические-микс-инфекции – *C. pyogenes*, *Pseudomonas aur.*, *Streptococcus heamo.*, *Staphylococcus pyog.*, *Proteus spp.*, *Mycoplasma*, которые иначе нарушают плодovитость крупного рогатого скота.

Во-вторых, витальность – % подвижность, и пенетрирующая мощь, иммунологические свойства сперматозоидов также играют большую роль в неуспешном оплодотворении крупного рогатого скота.

На этих основаниях нужна постоянная специальная работа, так как только здоровые племенные быки – ИО центры дают возможность надёжную трансмиссию генетического развития крупного рогатого скота, т.е. производство молока и мяса для всё более численной популяции людей в мире.

Ключевые слова: мультипатический этиопатогенез, органические заболевания, неплodовитость быков

**PRASKOZORJE POJAVI ČASOPISA „VETERINARSKI GLASNIK”
1904 – 2004. godine za stogodišnjicu**

Mada se tek otrgla od azijskog ropstva, tadašnja Srbija je krupnim koracima grabila prema „evropeizaciji”, žurno hitajući skoro u svim oblastima ka „jevinejskom” životu. Kao da je htela da što dublje udahne „evropskog vazduha”, čime bi učinila preporod.

Oprezno, i još uvek mlada, krhka država, iz bojaznosti da opet ne zapadne u tamu i muke nekog od tuđina, Srbija krajem 18. veka mnogo je činila u formiranju i uređenju svoje vojske. Kako bi vojnik-ratnik bez svog konja, budući da je dobar deo ratovanja proveo na njemu, njegovim leđima, bilo u osvajanju tuđih ili pak braneći svoju teritoriju.

Tako je i Srbija krajem 18. veka činila mnogo da opskrbi svoju vojsku što boljim regrutima u konjanicima, ali i srpskim marvenim lekarima kao „servisnom službom”. Zna se pouzdano da su oni malobrojni marveni lekari „škole za životinjsku medicinu” završavali po „evropejskim” zemljama, posebno u Beču, Budimpešti, pa i Berlinu i još drugde. A bilo ih je i sa strane, posebno iz Češke, tj. Austrougarske [Antonije Kobliška (1806-1920), okružni marveni lekar; Emil Kra-tohvil (1860-1930), vojni marveni lekar].

Mada su uzorno služili svom otečestvu kao marveni lekari (bilo domaći ili pak stranci), još tada su osećali potrebu za međusobnim druženjem, pomaganjem jedno drugome u struci, a i da se profesionalno okupljaju, poneti navikama i usmerenjima sa svojih „jevinejskih” škola koje su ranije završili.

U prigodi takvih namera i strukovnih htenja održan je prvi srpski Zbor marvenih lekara daleke 1890. godine 21. oktobra u Beogradu u zgradi Srpskog poljoprivrednog društva. Osnivački Zbor otvoren je govorom sazivača g. Lazara Najdanovića u 10 sati pre podne. Posle ovoga izabrano je predsedništvo i to za predsednika Zbora g. Jovan Eker, za sekretara g. Milivoje Jovanović i Jovan Aleksić.

Inače, Zbor je održao svega sedam sednica i na njima je, između ostalog, odlučeno:

1. za stručne radove po struci veterinarstva da se osnuje „Arhiv za celokupno lekarstvo” koji će izlaziti godišnje. Za urednika su izabrani: g. Aleksa Lj. Popović i Stevan Ekerović;

2. da se preko lista Srpskog poljoprivrednog društva „Težak” „pružaju našem narodu nužne pouke iz marvenog lekarstva. Ove pouke da šalju marveni lekari Društvu, koje ima da se umoli da im se ustupi jedan odeljak u svom broju”.

Iz donetih odluka na Zboru vidi se potreba „marvenih lekara” onog doba, da postoji potreba za širim htenjima, tj. intelektualne aktivnosti iz svoje struke.

Na Zboru marvenih lekara postavljana su i druga značajna pitanja koja su se ticala marvene struke. Godina i datum (21. oktobar, 1890) očigledno ne čini utemeljenje Srpskog marvenog-lekarskog društva, već je to ostalo za kasnije. Bio je to prvi put Zbor srpskih marvenih lekara u tek novoformiranoj državi. Privremenoj upravi stavljeno je u zadatak da izradi nacrt statuta ovog Društva (kojeg će podneti na narednom Zboru na razmatranje).

Odlučeno je da se naredni Zbor marvenih lekara drži iduće 1891. godine o Blagovestima (7. aprila) u Kragujevcu. Zbor je zaključen 24. oktobra t.g. u 7 sati uveče.

Inače, učesnici Zbora su blagodarili gospodinu Ministru unutrašnjih dela, te Ministru vojnom, što su marvenim lekarima omogućili odsustvo iz službe i besplatan prevoz železnicom na Zbor marvenih lekara u Beogradu.

P.S.

Marvena lekarska struka ima zadatak da se organizuje, te da se vlada po Zakonu vojnom, donetom još 20. februara 1865. godine u Beogradu. Overeno pečatom Knjaževine Srbije i svojeručnim potpisom knjaza Mihaila M. Obrenovića.

Od tadašnjeg vremena (1890) prošlo je skoro deceniju i po kada je izašao (štampan) prvi broj „Veterinarskog glasnika“. Tim povodom održana je Skupština marvenih lekara u Kragujevcu 1903, tada već u Kraljevini Srbiji pod nastijom Karađorđević!

**Dr Mirko Predojević, profesor
Univerziteta u Temišvaru, Rumunija**

KALENDAR PLANIRANIH NAUČNIH I STRUČNIH SKUPOVA U ZEMLJI ZA 2004. GODINU

- 12-13.februar Beograd
25. seminar za inovacije znanja veterinara
Informacije: prof. dr Velibor Stojić, Katedra za fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/ 2684 351 ili 36 15 436 lok. 224.
12. februar Beograd
Predavanje u organizaciji SMASAP-a „Polineuropatije”
(predavač prof. dr Peter Šrenk, Republika Češka)
Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
27. februar Beograd
Inovacije znanja iz oblasti DDDD (stanje zaraznih boleti i zoonoza u SCG; rezistencija mikroorganizama na dezinficijense; prezentacije proizvođača DDDD sredstava)
Informacije: prof. dr Brana Radenković, Zoohigijena, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/684 173 ili 36 15 436 lok. 225.
27. mart Beograd
Okrugli sto SMASAP-a
„Tonzilitis u kliničkoj patologiji pasa – savremeni pristup”
Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
31. mart -
2. april Vlasinsko jezero
6. epizootiološki dani
Informacije: prof.dr Bosiljka Đuričić, Katedra za zarazne bolesti , Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/ 685 080 ili 36 15 436 lok.. 352, e-mail: bosa@beotel.yu
- 19 - 21. april Iriški Venac
5. simpozijum „Uzgoj i zaštita zdravlja svinja”
Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
24. april Beograd
„Kazusi” – prikazi slučajeva iz prakse u organizaciji SMASAP-a (mogućnost svih učesnika da prikažu neki interesantan slučaj iz vlastite prakse).
Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
24. april SVETSKI DAN VETERINARA
Informacije: World Veterinary Association,
website: www.worldvet.org/Press Release
- 15 - 23. maj Novi Sad
71. međunarodni poljoprivredni sajam
Informacije: Novosadski sajam, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 2, tel. 021/125-155
- 25 - 26. maj Novi Sad
Međunarodni simpozijum o infekciji goveda izazvanoj herpesvirusom-1 (IBR/ IPV)
Informacije: Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad, tel./fax. 021/477 6000; e-mail: vera@niv.ns.ac.yu; ili Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619,687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
- 27 - 29. maj Beograd
Simpozijum veterinara patologa Istočne Evrope
(u organizaciji fondacije „Charles Louis Davis, DVM Foundation”)
Informacije: prof. dr Sanja Aleksić-Kovačević, predsednik Organizacionog odbora, Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/ 685 710 ili 36 15 436 lok. 321

28. maj	Beograd Oftalmologija Edukativni kurs SMASAP-a i WSAVA-e (predavač prof. dr Peter Bedford, V. Britanija) Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
poslednja nedelja maja	Tara 15. savetovanje „DDDD u zaštiti životne sredine” Informacije: prof. dr Brana Radenković, Zoohigijena, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/ 2684 173 ili 36 15 436 lok. 225
2 - 5. jun	Teslić – Republika Srpska 10. savetovanje veterinara Republike Srpske Informacije: Društvo veterinara Republike Srpske, Banja Luka, Knjaza Miloša 21, tel. 051/313 164, 313 067, faks 348 283
14 - 18. jun	Budva 6. savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja „Clinica veterinaria 2004” Informacije: prof. dr Dragiša Trailović, Katedra za dijagnostiku, patologiju i terapiju oboljenja domaćih životinja, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/36 11 810, e-mail: trailo@net.yu
treća nedelja juna	Kragujevac Škola ultrazvuka Edukacioni centar ultrazvuka u medicini i veterini (pet dana) Informacije: prof. dr Vojislav Pavlović, Katedra za porodiljstvo, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/2684 184 ili 3615 436, lok. 252
septembar	Zlatibor 16. savetovanje veterinara Srbije Informacije: Srpsko veterinarsko društvo, prof.dr Bosiljka Đuričić, Katedra za zarazne bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/ 685 080 ili 36 15 436 lok. 352, e-mail: bosa@beotel.yu
četvrta nedelja septembra	13. savetovanje živinara Jugoslavije Informacije: Časopis „Živinarstvo”, Bulevar JNA 18, 11000 Beograd, tel. 011/657 953, faks 644 841
25. septembar	Beograd Edukacija SMASAP-a po izabranoj temi Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
oktobar	53. savetovanje industrije mesa Informacije: Institut za tehnologiju mesa, 11000 Beograd, Kačanskog 13, tel. 011/2650 655, faks 651 825, e-mail: meatinst@beotel.yu
30. oktobra	Beograd „Kazusi” – prikazi slučajeva iz prakse u organizaciji SMASAP-a (mogućnost svih učesnika da prikažu neki interesantan slučaj iz vlastite prakse). Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619,687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
5 - 6. novembar	Beograd Godišnje Savetovanje veterinara male prakse - SMASAP-a Informacije: Veterinarska komora Srbije, 11129 Beograd, Bulevar JNA 18, tel/faks 011/ 2684 597, 685 619, 687 475, e-mail: vetks@eunet.yu
20. novembra	Beograd 3. savetovanje o biologiji i zdravstvenoj zaštiti pčela Informacije: prof. dr Zoran Stanimirović, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar JNA 18, tel. 011/685 080 ili 3615 436 lok. 300

**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
U BEOGRADU 2003. GODINE**

Doktorirali:

Željko Ćupić
Anita Radovanović
Branislav Prokić
Snežana Ivanović
Zoran Popović

Magistrirali:

Bratislav Milošević
Ksenija Nešić
Vesna Budimirović
Mihajlo Vićentijević
Dragan Đurđević
Srđan Jovanović
Elizabeta Hristova
Mirjana Đokić
Branislava Slavata
Miroslav Blagojević

Specijalizirali:

Zoran Savanović
Nataša Mladenović
Dragana Todorović
Robert Molnar
Stevan Mitković
Ljiljana Angelkova
Olivera Radulović
Boban Popović
Mustafa Sulejmani
Gordana Pavlović
Željko Rađenović
Snežana Milosavljević
Predrag Kuprešanin
Vladimirka Ninković

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE U BEOGRADU 2003. GODINE

Brankov M. Ivan

Rođen 26. 11. 1973. u Vršcu.
Diplomirao 26. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Dušana Vlajića 22/7.

Aleksić D. Ana

Rođena 15. 5. 1974. u Čačku.
Diplomirala 24. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Čačak
7. jula 4/14.

Gavrilović D. Pavle

Rođen 11. 10. 1976. u Pančevu.
Diplomirao 9. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Pančevo
Kikindska 15.

Srbljanović M. Neda

Rođena 1. 1. 1977. u Pljevljima.
Diplomirala 27. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Zemun
Vladimira Gordana 43.

Vukosavljević Ž. Bojan

Rođen 3. 5. 1974. u Subotici.
Diplomirao 10. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Subotica.

Marković M. Jasmina

Rođena 5. 9. 1972. u Šapcu.
Diplomirala 10. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Šabac
Bore Tirića 89.

Radosavljević R. Ksenija

Rođena 22. 8. 1977. u Užicu.
Diplomirala 24. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Anastasa Jovanovića 3/31.

Milosavljević D. Dejan

Rođen 25. 12. 1975. u Beogradu.
Diplomirao 9. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Novi Beograd
Otona Župančića 28/40.

Jovanović T. Serafim

Rođen 12. 5. 1975. u Skoplju.
Diplomirao 10. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Bulevar Arsenija Čarnojevića 51/29.

Stanić G. Nikolina

Rođena 18. 12. 1977. u Metkoviću.
Diplomirala 23. 8. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Belegiš
Pere Radinovića bb.

Radlović N. Vladimir

Rođen 8. 7. 1976. u Beogradu.
Diplomirao 8. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Kikinda
Svetožara Miletića 88.

Vidaković P. Nataša

Rođena 24. 6. 1967. u Zagrebu.
Diplomirala 25. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Braće Srnić 53/5.

Aranitović B. Petar

Rođen 14. 7. 1970. u Somboru.
Diplomirao 11. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Sombor
JNA D3 I/7.

Stanković S. Lidija

Rođena 21. 7. 1970. u Nišu.
Diplomirala 11. 7. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Niš
Berbatovačka 12a.

Ivanović R. Marina

Rođena 11. 1. 1979. u Požarevcu.
Diplomirala 27. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Kumane
Topolovnik

Tošić R. Dragan

Rođen 24. 7. 1976. u Sarajevu.
Diplomirao 22. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Sretena Mladenovića - Mike 4.

Milošević I. Želimir

Rođen 4. 5. 1971. u Banja Luci
Diplomirao 23. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Carice Milice 52.

Blagojević M. Miloš

Rođen 17. 5. 1978. u Beogradu.
Diplomirao 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Zemun
Dragana Rakića 7.

Arsenović S. Dragan

Rođen 31. 1. 1972. u Sl. Brodu
Diplomirao 25. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Brđarica
Draginje.

Petrović M. Živojin

Rođen 17. 1. 1972. u Loznici.
Diplomirao 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Loznica
Dositeja Obradovića 40.

Pavković M. Boža

Rođen 19. 10. 1977. u Zemunu.
Diplomirao 23. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Dobanovci
Sremska 20.

Predojević M. Gordana

Rođena 11. 11. 1977. u Beogradu.
Diplomirala 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka St. Banovci
Sremska 1.

Vlajković A. Marijan

Rođen 18. 6. 1973. u Ban. Karlovcu.
Diplomirao 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Banatski
Karlovac, Slobodana Penezića 9.

Markuš M. Mirko

Rođen 15. 8. 1978. u Zagrebu.
Diplomirao 25. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Novi Beograd
Bulevar Arsenija Černojevića 46.

Cvejić S. Dejan

Rođen 31. 5. 1979. u Puli.
Diplomirao 23. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd
Uralska 36.

Šćekić R. Vladimir

Rođen 12. 8. 1976. u Užicu.
diplomirao 23. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Požega
Heroja Bondžulića 31/51.

Ševo M. Dragana

Rođena 6. 9. 1977. u N. Beogradu
Diplomirala 25. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Novi Beograd
Bulevar Arsenija Čarnojevića 130/6.

Putnik M. Slobodan

Rođen 15. 8. 1977. u Beogradu.
Diplomirao 27. 3. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Obrenovac
Marka Miranovića 19b.

Milovanović M. Goran

Rođen 30. 11. 1961. u Leskovcu.
Diplomirao 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Bojnik
Trg Slobode 13.

Đmura M. Goran

Rođen 13. 4. 1977. u Bijeljini.
Diplomirao 25. 6. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Bijeljina.
Stefana Dečanskog 239.

Rankov M. Radivoj

Rođen 17. 12. 1968. u Srem. Mitrovici.
Diplomirao 25. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Sremska
Mitrovica, Đure Jakšića 52.

Marjanović M. Radoslav

Rođen 3. 4. 1974. u Novom Sadu.
Diplomirao 28. 10. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Bačka Palanka
Đorđa Zučića 6.

Milić S. Siniša

Rođen 4. 9. 1977. u Sisku.
Diplomirao 27. 10. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Prigrevica
Nine Marakovića 33.

Golić M. Bojan

Rođen 27. 11. 1977. u Gradiški.
Diplomirao 29. 10. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Gradište

Mijatović T. Vladimir

Rođen 14. 4. 1976. u Šapcu.
Diplomirao 28. 10. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Šabac

Antić B. Dragan

Rođen 2. 8. 1977. u Surdulici.
Diplomirao 29. 10. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Surdulica

Ćećez D. Siniša

Rođen 10. 11. 1977. u Čačku.
diplomirao 24. 9. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Čačak

Stošić R. Oliver

Rođen 17. 9. 1976. u Trgovištu.
Diplomirao 24. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Trgovište

Šarac M. Novak

Rođen 14. 12. 1977. u Somboru.
Diplomirao 24. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Sombor

Ružić D. Lidija

Rođena 2. 10. 1965. u Varavarinu.
Diplomirala 26. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Varvarin

Stojčić M. Dušan

Rođen 3. 9. 1978. u Gradiškoj.
Diplomirao 25. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Gradište

Stošić S. Ljiljana

Rođena 13. 6. 1973. u Vranju.
Diplomirala 27. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Vranje

Bosanac L. Dejan

Rođen 23. 2. 1978. u Virovitici.
Diplomirao 25. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Virovitica

Stojković M. Tatjana

Rođena 4. 4. 1975. u Beogradu.
Diplomirala 27. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd

Živković Ž. Dragan

Rođen 25. 3. 1976. u Kruševcu.
Diplomirao 25. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Kruševac

Pokorić B. Igor

Rođen 8. 7. 1977. u Subotici.
Diplomirao 25. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Subotica

Surla D. Tamara

Rođena 27. 11. 1975. u Bihaću.

Diplomirala 27. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd

Bečkej L. Žolt

Rođen 14. 1. 1979. u B. Topoli.
Diplomirao 10. 12. 2003. godine.
Stalno mesto boravka B. Topola

Rajković D. Branislav

Rođen 6. 7. 1972. u Beogradu.
diplomirao 27. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd

Marković Ž. Marija

Rođena 25. 11. 1980. u Beogradu.
Diplomirala 26. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd

Kukolj M. Vladimir

Rođen 31. 1. 1980. u Gradačcu.
Diplomirao 23. 12. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Gradačac

Petrović K. Jovan

Rođen 20. 3. 1977. u Beogradu.
Diplomirao 28. 11. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Beograd

Lazić M. Dušan

Rođen 30. 11. 1964. u Deronjama.
Diplomirao 22. 12. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Deronje

Andrić N. Bojan

Rođen 25. 5. 1978. u Podgorici.
Diplomirao 29. 12. 2003. godine.
Stalno mesto boravka Podgorica