

YU ISSN 0350-2457
UDK 619 (05)

VETERINARSKI GLASNIK

**naučni časopis
scientific journal**

Veterinarski glasnik je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Veterinarski glasnik is published by Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade

VET. GLASNIK Vol. 64 Br. 3-4 Str. 157-304 Beograd, 2010.



IZDAVAČ:
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE UNIVERSITY OF BELGRADE
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЈ МЕДИЦИНЫ УНИВЕРСИТЕТА В БЕЛГРАДЕ

SUIZDAVAČ: **Veterinarska komora Srbije**
COPUBLISHER: **Veterinary Chamber of Serbia**

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK – EDITOR IN CHIEF: *Vitomir Čupić*

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD:
Vojin Ivetić, Milovan Jovičin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Radoljub Tadić, Jadranka Tijanić, Dragiša Trailović

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Jadranka Tijanić*

LEKTORI – LECTORS:
Sanja Vranić, za srpski jezik / for Serbian language
Danijela Gledić, za engleski jezik / for English language
Boško Bošković, za ruski jezik / for Russian language

GODIŠNJE SE OBJAVLJUJE 6 BROJEVA ČASOPISA

Godišnja pretplata: za pravna lica 6 000 dinara
za individualne pretplatnike 2 000 dinara
za inostranstvo 200 USD
(*The annual subscription outside Serbia is 200 US \$*)

Žiro račun broj: 205-2982-66

U finansiranju časopisa učestvuje:
Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije
Publication of this journal is financially supported by:
Ministry of Science and Technological Development of Republic Serbia

Štampa – Printers: *SZR „Simić Zuhra”, Beograd, Vitanovačka 15*

Adresa časopisa:
Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik, 11000 Beograd,
Bulevar oslobođenja 18, tel/faks 011/2684-597, 2687-475,
e-mail: vetks@eunet.rs; www.vetks.org.rs



VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 64 Br. 3 - 4 str. 157 - 304 Beograd, 2010.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Milić N., Nišavić J., Ašanin Ružica, Knežević Aleksandra, Ašanin Jelena, Vidanović D., Šekler M.: Primena lančane reakcije polimeraze (PCR) i metode Real-time PCR u brznoj identifikaciji goveđeg herpesvirusa 1
Implementation of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time PCR in Quick Identification of Bovine Herpesvirus 1
Применение цепной реакции полимеразы (ЦРП) и методы *Real-time* ЦРП в быстрой идентификации говяжьего герпесвируса I 159
- Mujezinović Indira, Čupić V., Smajlović A., Muminović M.: Identification of Histaminic (H₁-Type) Receptors in Small Intestine of Broilers By Application of Histamine and Some of its Agonists and Antagonists
Utvrđivanje histaminskih receptora H₁ tipa u tankom crevu brojlera primenom histamina i nekih njegovih agonista i antagonista
Утверждение гистаминных рецепторов H₁ типа в тонкой кишке бройлеров применением гистамина и некоторых его агонистов и антагонистов 169
- Jezdimirović Milanka, Aleksić Nevenka, Radojičić Biljana: Komparativno ispitivanje efikasnosti eugenola i benzil-benzoata u terapiji šuge ovaca
Investigation of Comparative Efficacy of Eugenol and Benzyl Benzoate in Therapy of Sheep Mange
Сравнительное испытание эффективности эугенола и бензил-бензоата в терапии парши овец 177
- Zadnik T.: A Retrospective Study of Peritoneal Fluids in Cows with Abdominal Disorders
Retrospektivna studija peritonealnih tečnosti kod krava sa poremećajima abdomena
Ретроспективное изучение перитонеальных жидкостей у коров с расстройствами абдомена 187
- Šamanc H., Kirovski Danijela, Adamović M., Vujanac I., Prodanović R., Radivojević M., Nikić D., Tulcan Camelia: Uticaj davanja energetskog dodatka u hrani na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate visokomlečnih krava
Effect of Administering Energy Supplement in Feed on Body Condition and Performance of High-Yield Dairy Cows
Влияние дачи энергетической добавки в корме на состояние здоровья и производственные результаты высоко-молочных коров. 197
- Grdović Svetlana, Šefer D., Petrujković B.: Uticaj biljnih ekstrakata dodatih u hranu na proizvodne i reproduktivne rezultate preživara
Possibilities for Using Plant Extracts Added to Ruminant Feed Aimed at Improving Production Results
Влияние растительных экстрактов добавленных в корм на производительные и репродуктивные результаты жвачных животных 207

■ Davidović Vesna, Lazarević M., Joksimović-Todorović Mirjana, Maksimović Z., Jovanović M., Miljas N.: Uticaj ekstrakta podzemnih organa <i>Helleborus odorus W. et K.</i> na crvenu krvnu sliku Wistar pacova Influence of Extracts of <i>Helleborus Odorus W. et K.</i> Underground Parts on Red Blood Cell Count of Wistar Rats Влияние экстракта подземных органов <i>Helleborus odorus W. et K.</i> на красную кровяную картину <i>Wistar</i> крыс	219
■ Vakanjac Slobodanka, Todorović I.: Supklinički mastitisi ovaca: uzročnici i njihova osetljivost na pojedine antimikrobne lekove Subclinical Mastitis in Sheep – Causes and their Sensitivity to Antibiotics Подклинические маститы овец - возбудители и их чувствительность к антибиотикам	231
■ Kosovac Olga, Živković B., Radović Č.: Komparativni prikaz kvaliteta svinjskih polutki primenom različitih metoda ispitivanja Comparative Presentation of Quality of Pig Carcass Halves Using Different Examination Methods Сравнительный показ качества свиных туш применением различных методов испытания	243
PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ	
■ Trailović S. M. : Farmakološki receptori nematoda kao ciljna mesta delovanja antiparazitskih lekova Pharmacological Receptors of Nematoda as Target Points for Action of Antiparasitic Drugs Фармакологические рецепторы нематодов как целевые места действия антипаразитарных лекарств	253
■ Milovanović Mirjana, Jovanović M., Vučković Sonja, Prostran Milica: Farmakoterapija kancerskog bola kod pasa i mačaka Pharmacotherapy of Cancer Pain in Dogs and Cats Suffering from Cancer Фармакотерапия канцерной боли у собак и кошек	265
■ Velhner Maja, Kozoderović Gordana, Jelesić Zora, Stojanov I., Ratajac R., Stojanović Dragica: Rezistencija bakterija na hinolone i njen uticaj na zdravlje ljudi i životinja Mechanisms of Quinolone Resistance and Implications for Human and Animal Health Механизмы сопротивления бактерий на хинолоны и влияние на здоровье людей и животных	277
■ Spasojević Kosić Ljubica, Trailović D. R.: Mogućnosti primene farmakološkog stres testa u funkcionalnom ispitivanju srca kod pasa Possibilities of Applying Pharmacological Stress Testing in Assessment of Heart Functional Capacity in Dogs Возможности применения фармакологического стресс теста в функциональном испытании сердца у собак	287
DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ	297
UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS	301

**PRIMENA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE (PCR) I
METODE REAL-TIME PCR U BRZOJ IDENTIFIKACIJI
GOVEĐEG HERPESVIRUSA 1***

**IMPLEMENTATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND
REAL-TIME PCR IN QUICK IDENTIFICATION OF BOVINE
HERPESVIRUS 1**

**N. Milić, J. Nišavić, Ružica Ašanin, Aleksandra Knežević, Jelena Ašanin,
D. Vidanović, M. Šekler****

Ukupno je ispitivano 65 uzoraka nosnih briseva prikupljenih od teladi i junadi sa kliničkim simptomima respiratorne infekcije na prisustvo goveđeg herpesvirusa 1 uporednom primenom molekularnih i standardnih metoda virusološke dijagnostike. Kod inokulisanih ćelijskih linija nije ustanovljena pojava citopatogenog efekta (CPE -) posle 24h, 48h i 72h od inokulacije ni posle dve uzastopne pasaže uzoraka ispitivanog materijala kroz navedene ćelijske linije. Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B i timidin-kinazu, utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 u jednom uzorku nosnog brisa, dok je ispitivanjem navedenih uzoraka nosnih briseva goveda metodom Real-Time PCR prisustvo pomenutog virusa ustanovljeno kod tri uzorka.

Ključne reči: goveđi herpesvirus 1, PCR, Real-time PCR

Uvod / Introduction

Goveđi herpesvirus 1 (BHV1) pripada rodu *Varicellovirus*, podfamiliji *Alphaherpesvirinae* i familiji *Herpesviridae*. Izaziva infektivni bovini rinotraheitis, oboljenje goveda koje su prvi opisali Štedam (Steddham) 1889. i Parker, 1908, (B.

* Rad primljen za štampu 14. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Nenad Milić, redovni profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, docent, dr sci. med. vet. Ružica Ašanin, redovni profesor, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; Aleksandra Knežević, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; D. Vidanović, Milanko Šekler, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

Mihajlović, 1987). Oni koji su se njome kasnije bavili različito su je imenovali – kontagiozna bronhopneumonija, emfizematozna bronhopneumonija i dr.

Infekcija organa za disanje nastaje kapljicama sekreta poreklom od inficiranih životinja, a ređe se prenosi indirektno (hranom, transportnim sredstvima...). Nepovoljni uslovi držanja i ishrane životinja olakšavaju nastanak bolesti. Virus napada sluzokožu gornjih respiratornih puteva (nosa, traheje), a nekada i bronhije, izazivajući pri tom kataralno zapaljenje. Usled sekundarnih bakterijskih infekcija proces se može proširiti descedentno na pluća što dovodi do pojave bronhopneumonije kod inficiranih životinja.

Infekcija goveda izazvana goveđim herpesvirusom 1 pojavljuje se u više kliničkih oblika. Prvi je infektivni bovini rinotraheitis (IBR) koji se manifestuje pojavom akutnog oboljenja gornjih respiratornih puteva, konjunktivitisom i bronhopneumonijom. Ovaj oblik infekcije izaziva 1.1 podtip goveđeg herpesvirusa 1. Drugi oblik navedene infekcije goveda se ispoljava kao oboljenje genitalnih organa poznato u Evropi kao *exantema coitale vesiculosum*, a u Americi kao infektivni pustulozni vulvovaginitis (IPV) koje izazivaju podtipovi 1.2a i 1.2b goveđeg herpesvirusa 1. Infekcija se manifestuje pojavom osipa i zapaljenja vulve i vagine krava, odnosno balanopostitisa kod bikova.

Pored standardnih metoda virusološke dijagnostike, koje obuhvataju izolaciju virusa na kulturi tkiva i njegovu identifikaciju primenom virus-serum neutralizacionog testa, za brzo i direktno dokazivanje prisustva nukleinske kiseline virusa u uzorcima ispitivanog materijala poreklom od goveda sve više se koriste molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze kao što su PCR i Real-time PCR. Iz navedenih razloga i naša istraživanja imala su za cilj da utvrde opravdanost korišćenja navedenih molekularnih metoda za brzu detekciju i identifikaciju nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 u nosnim brisevima goveda uzorkovanim na nekim farmama u Republici Srbiji.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Uzorci nosnih briseva goveda / Samples of bovine nasal smears

Ukupno je ispitivano 65 uzoraka nosnih briseva prikupljenih od teladi i junadi sa nekoliko farmi u Republici Srbiji. Životinje od kojih su uzimani brisevi imale su nespecifične kliničke znake respiratorne infekcije kao što su temperatura, otežano disanje i iscedak iz nosa. Brisevi su potapani u hranljivu podlogu Eagle – MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma i čuvani na temperaturi od -20°C do ispitivanja.

Referentni soj goveđeg herpesvirusa 1 / Reference strain of bovine herpesvirus 1

U ispitivanjima je korišćen referentni soj goveđeg herpesvirusa 1 – TN-41, titra $10^{8.1}$ TCID₅₀/1 mL, lot 971119, American Bio Research, Sevierville Tennessee, USA.

Ćelijska linija Vero / Vero cell line

Posle obrade nosnih briseva teladi i junadi, suspektan material je inokulisan u kulturu tkiva radi ispitivanja na prisustvo goveđeg herpesvirusa 1 kao i izvođenja testa virus-serum neutralizacije (VN testa). Za navedene svrhe korišćena je kontinuirana ćelijska linija Vero koja je održavana standardnom metodom tripsinizacije i supasažama.

Obrada uzoraka nosnih briseva ispitivanih na prisustvo virusa BHV 1 /

Processing of nasal smear samples examined for presence of BHV 1

Uzorci nosnih briseva goveda su neposredno posle uzimanja potapani u hranljivu podlogu Eagle – MEM sa 2% fetalnog telećeg seruma, a zatim dopremani u laboratoriju. U laboratoriji je sadržaj iz epruveta prebacivan u sterilne kivete i centrifugovan 15 minuta na 2500 o/min. Uzorci supernatantne tečnosti su zatim u količini od po 0,5 ml pojedinačno inokulisani u ćelijske linije Vero radi izolacije virusa BHV 1 i njegove identifikacije primenom metode virus-serum neutralizacije (VN testa). Talog ćelija dobijen centrifugovanjem uzoraka je direktno korišćen za izvođenje lančane reakcije polimeraze (PCR) i metode Real-time PCR.

Postupak sa inokulisanim ćelijskim linijama / Procedure with inoculated cell lines

Ćelijske linije Vero, pojedinačno inokulisane sa po 0,5 ml supernatantne tečnosti poreklom od centrifugovanih uzoraka nosnih briseva i inkubisane na temperaturi od 36°C, svakodnevno su posmatrane tokom 72h na pojavu citopatogenog efekta. Tokom ispitivanja su izvršene dve sukcesivne pasaže ispitivanog materijala kroz ćelijske linije Vero.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) / Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ekstrakcija virusne DNK / Extraction of virus DNA

Ekstrakcija virusne DNK iz uzoraka nosnih briseva goveda radi izvođenja lančane reakcije polimeraze vršena je primenom QIAmp DNA mini kita (50) za 50 ekstrakcija DNK virusa iz tkiva i tkivnih tečnosti, proizvođača QIAGEN Inc., Valencia, CA, SAD, prema Uputstvu proizvođača.

Procedura za izvođenje lančane reakcije polimeraze /

Procedure for performing PCR

Za izvođenje lančane reakcije polimeraze korišćeni su prajmeri koji amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu timidin-kinaze (Yason i sar., 1994) i prajmeri koji amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu glikoproteina B (gB) spoljašnjeg omotača virusa BHV1 (Yason i sar., 1994; Fuchs i sar., 1999). Lančana reakcija polimeraze je obuhvatala sledeće cikluse: preliminarnu denaturaciju na temperaturi od 95°C u trajanju od 1 minuta, zatim 34 ciklusa koji su podrazumevali denaturaciju na temperaturi od 95°C u tra-

janju od 1 minuta, vezivanje prajmera na temperaturi od 61°C u trajanju od 1 minuta i elongaciju na temperaturi od 72°C u trajanju od 1 minuta kao i finalni ciklus na temperaturama od 95°C u trajanju od 1 minuta, 61°C u trajanju od 1 minuta i 72°C u trajanju od 5 minuta. Za analizu dobijenih PCR produkata korišćena je horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Veličina dobijenih fragmenata molekula DNK je upoređivana sa DNK standardom radi očitavanja rezultata reakcije. Otkrivanje PCR produkata odgovarajuće veličine sa određenim brojem baznih parova smatrano je pozitivnim nalazom.

Real-time PCR / Real-time PCR

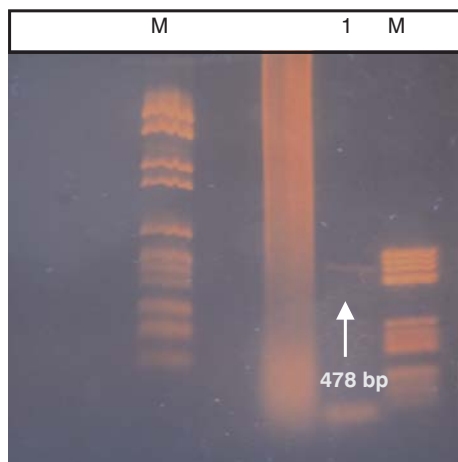
Otkrivanje prisustva, identifikacija i kvantifikacija goveđeg herpesvirusa 1 u uzorcima nosnih briseva goveda vršena je primenom metode Real-time PCR po proceduri propisanoj od strane Međunarodne organizacije za epizootije (OIE Manual, 2008), koja je uključivala prajmere i probu specifične za deo gena na molekulu virusne DNK koji kodira sintezu glikoproteina B (gB).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

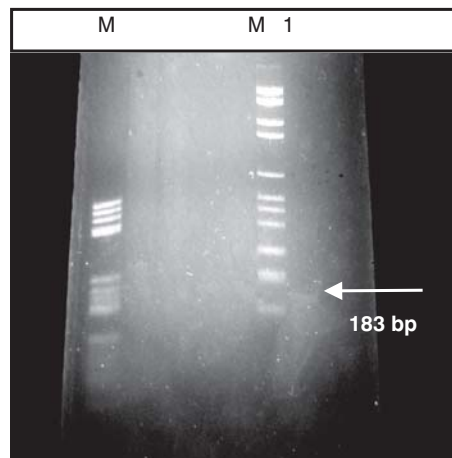
Uzorci ispitivanog materijala dobijeni obradom šezdeset pet nosnih briseva goveda su pojedinačno inokulisani u ćelijske linije Vero i svakodnevno posmatrani na pojavu citopatogenog efekta (CPE). Kod inokulisanih ćelijskih linija nije ustanovljena pojava citopatogenog efekta (CPE-) posle 24h, 48h i 72h od inokulacije ni posle dve uzastopne pasaže uzoraka ispitivanog materijala kroz navedene ćelijske linije.

S obzirom na to da izolacija virusa na kulturi tkiva radi njegove identifikacije virus-serum neutralizacionim testom često zahteva duži vremenski period i više supasaža ispitivanog materijala kroz ćelijske linije, posle kojih takođe može izostati pojava citopatogenog efekta, danas se u navedene svrhe sve više primenjuju molekularne metode virusološke dijagnostike. Navedene metode molekularne dijagnostike omogućavaju brzu i direktnu identifikaciju virusa dokazivanjem prisustva virusne DNK u uzorcima suspektog materijala. Od molekularnih metoda najčešće se koriste lančana reakcija polimeraze (PCR) i metoda Real-time PCR.

U istim uzorcima nosnih briseva je direktno ispitivano prisustvo nukleinske kiseline goveđeg herpesvirusa 1 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) uz korišćenje prajmera za glikoprotein B spoljašnjeg omotača virusa BHV 1 i timidin-kinazu. Kod jednog uzorka nosnog brisa goveda utvrđeno je prisustvo nukleinske kiseline navedenog virusa (1,53%). Posle elektroforetske analize uzoraka, ustanovljeno je da veličina amplifikovanog DNK fragmenta iznosi 478bp za glikoprotein B (slika 1) i 183bp za timidin-kinazu (slika 2).



Slika 1. *M – DNK standardi*
1 – DNK fragment virusa BHV 1 (gB) /
 Figure 1. *M – DNA standard*
1 – DNA fragment of BHV 1 virus (gB)



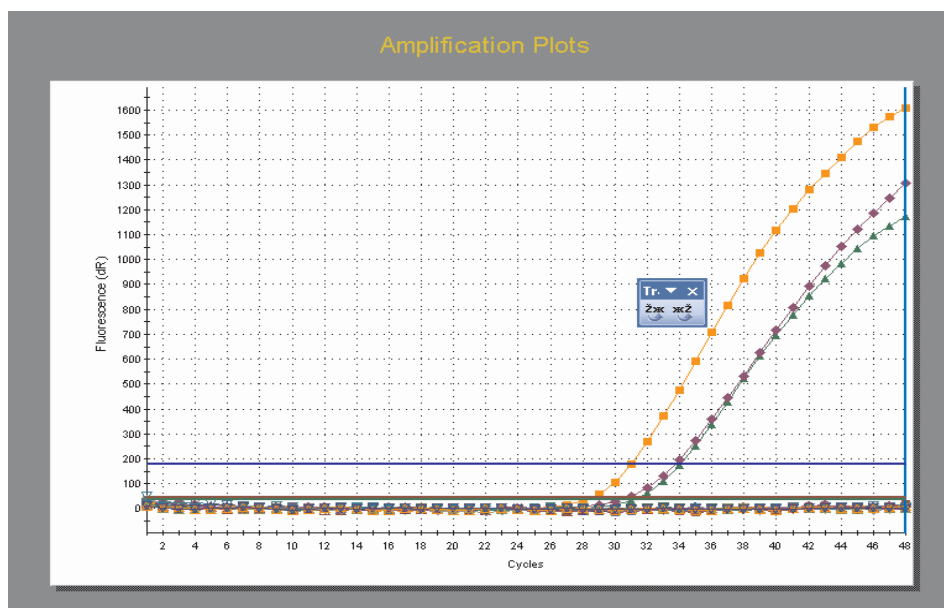
Slika 2. *M-DNK standardi,*
1 – DNK fragment virusa BHV 1 (tk) /
 Figure 2. *M – DNA standard*
1 – DNA fragment of BHV 1 virus (tk)

Vilcek i sar. (1995) su ispitivali prisustvo virusa BHV 1 u uzorcima nosnih briseva, pluća, limfnih čvorova i trahealne mukoze goveda primenom više metoda: izolacije virusa na kulturi tkiva i VN testa kao i lančane reakcije polimeraze. Uzorci su sakupljeni u Škotskoj sa 16 područja u kojima je došlo do prijave herpesvirusne infekcije. Posle obrade, uzorci su inokulisani u ćelijsku liniju MDBK i svakodnevno praćeni na pojavu citopatogenog efekta. Ispitivanjem 27 uzoraka suspektog materijala metodom izolacije virusa na kulturi tkiva, autori su prisustvo virusa utvrdili u 13 uzoraka (48,14%), dok je primenom lančane reakcije polimeraze nukleinska kiselina virusa BHV 1 ustanovljena u 18 uzoraka (66,66%). Ros i Belak (1999) su primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) ispitivali sličnost u strukturi genoma nekoliko srodnih herpesvirusa i to goveđeg herpesvirusa 1, goveđeg herpesvirusa 5, herpesvirusa 1 koza i herpesvirusa 1 jelena, kao i mogućnost njihovog otkrivanja i identifikacije u uzorcima suspektog materijala poreklom od navedenih životinja. Za izvođenje lančane reakcije polimeraze su pored ostalih prajmera za identifikaciju navedenih herpesvirusa koristili i prajmere za glikoprotein B. Na osnovu filogenetske analize gena koji kodiraju sintezu glikoproteina gB i gD virusa BHV1 autori su ustanovili visok stepen srodnosti između goveđeg herpesvirusa 5 i goveđeg herpesvirusa 1 kao i između podtipova 1 i 2 virusa BHV 1, odnosno filogenetska udaljenost od herpesvirusa 1 koza. Za izvođenje lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za glikoprotein B spoljašnjeg omotača virusa može se ustanoviti i prisustvo virusa BHV5 u uzorcima nosnih briseva goveda, zbog veličine DNK fragmenta koja je iznosila 478bp. Radi sigurne identifikacije goveđeg herpesvirusa 1 korišćena je i lančana reakcija po-

limeraze uz primenu prajmera za timidin-kinazu (TK). Navedeni prajmeri amplifikuju deo gena na molekulu virusne DNK koji je odgovoran za kodiranje sinteze timidin-kinaze. Izbor prajmera za timidin-kinazu izvršen je iz sledećih razloga (Moore i sar., 2000): a) enzim timidin-kinaza predstavlja značajan faktor patogenosti virusa BHV1, a sekvenca gena u molekulu virusne DNK koja kodira sintezu ovog enzima prisutna je kod svih patogenih sojeva navedenog virusa; b) nukleotidna sekvenca gena za timidin-kinazu nekoliko sojeva virusa BHV1 (soj 6660, LA i dr.) poznata je više godina; c) modifikovani mutanti BHV1 koji se koriste za pripremu vakcina kod goveda protiv ove herpesvirusne infekcije. Pošto su u vakcini ireverzibilno atenuisani postupkom koji podrazumeva deleciju gena odgovornih za kodiranje sinteze timidin-kinaze, korišćenje PCR procedure uz primenu prajmera za timidin-kinazu omogućava razlikovanje vakcinalnih sojeva virusa. Tako na primer tk soj BHV1 koji potiče od divljih sojeva virusa koji izazivaju prirodnu infekciju goveda i d) deo gena koji kodira sintezu timidin-kinaze je odvojen iz genoma virusa BHV5, tako da primena odgovarajućeg PCR protokola uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu omogućava diferenciranje ovog virusa od virusa BHV1. Yason i sar. (1995) su ispitivali mogućnost primene lančane reakcije polimeraze uz korišćenje oligonukleotidnih prajmera za timidin-kinazu za otkrivanje prisustva virusa BHV1 u kulturi tkiva. Veličina amplifikovanih DNK produkata dobijenih primenom prethodno navedene metode je iznosila 183bp. Na osnovu rezultata ispitivanja, autori su utvrdili da je metoda PCR, korišćena za otkrivanje prisustva referentnog soja LA virusa, imala istu osetljivost kao metoda izolacije virusa u kulturi tkiva i da se uspostavljena procedura za izvođenje lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu može uspešno koristiti u rutinskoj dijagnostici infekcije goveda izazvane goveđim herpesvirusom 1.

Uzorci nosnih briseva goveda koji su poticali sa naših farmi teladi i junadi su, pored izolacije na kulturi tkiva i metode lančane reakcije polimeraze uz korišćenje prajmera za timidin-kinazu i glikoprotein B, ispitivani na prisustvo nukleinske kiseline virusa BHV 1 i primenom metode Real-time PCR. Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili prisustvo goveđeg herpesvirusa kod tri uzorka nosnih briseva goveda (4,61%). Dobijene Ct vrednosti ispitivanih uzoraka su iznosile 30.94, 33.65 i 33.98 (slika 3).

Wang i sar. (2008) su koristili metodu Real-time PCR za detekciju goveđeg herpesvirusa 1 u uzorcima semena bikova. Uzorci semena su bili poreklom od prirodno i veštački inficiranih bikova i semena poreklom od neinficiranih i seronegativnih bikova. Ove rezultate ispitivanja autori su upoređivali sa rezultatima dobijenim primenom metode izolacije virusa u kulturi tkiva i tada su ustanovili da je osetljivost i specifičnost metode Real-time PCR veća od osetljivosti i specifičnosti metode izolacije virusa na kulturi tkiva. Osetljivost metode Real-Time PCR iznosila je 82,7% u odnosu na 53,6% metode izolacije virusa na kulturi tkiva, a specifičnost metode Real-time PCR iznosila je 93,6%, a metode izolacije virusa na kulturi tkiva 84,6%.



Slika 3. Rezultati ispitivanja uzoraka nosnih briseva goveda primenom metode Real-time PCR (OIE Manual, 2008) /

Figure 3. Results of examinations of bovine nasal smear samples using Real-time PCR method (OIE Manual, 2008).

Rezultati napred navedenih ispitivanja su potvrdili da savremene molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (PCR i Real-time PCR) zbog visoke osetljivosti i specifičnosti imaju prednost u brznoj i pouzdanoj identifikaciji goveđih herpesvirusa u odnosu na klasične metode virusološke dijagnostike.

Zaključak / Conclusion

Rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost korišćenja molekularnih metoda – lančane reakcije polimeraze (PCR) i Real-time PCR za direktnu detekciju i brzu identifikaciju goveđeg herpesvirusa 1 u uzorcima nosnih briseva goveda, bez prethodne izolacije virusa na kulturi tkiva i njegove identifikacije primenom testa virus-serum neutralizacije. Šira primena navedenih molekularnih metoda, zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze, omogućila bi brzu i pravovremenu dijagnostiku infekcije goveda izazvane goveđeim herpesvirusom 1. Kontinuirano praćenje ove infekcije bi značajno doprinelo sprečavanju njenog širenja, a uz primenu odgovarajućih profilaktičkih mera i uspešnom suzbijanju ovog oboljenja u populaciji goveda.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Istraživanja opisana u ovom radu finansirana su od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije, u okviru projekta pod ev. brojem 20150. / *The investigations described in this work have been financed by the Republic of Serbia Ministry of Science within Project No. 20150.*

Literatura / References

1. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2498-507.
2. Mihajlović B. Mikrobiologija III, Rikecije i virusi. Naučna knjiga. Beograd, 1987.
3. Moore S, Gunn M, Walls D. A rapid and sensitive PCR – based diagnosis assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet Microbiol* 2000; 75: 145-53.
4. OIE Manual, 2008.
5. Ros C, Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1247-53.
6. Vilcek S, Nettleton PF, Herring AJ. Detection of bovine herpesvirus 1 in clinical samples by the polymerase chain reaction. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1995; 102(6): 249-50.
7. Wang J, O Keefe J, Orr D, Loth L, Banks M, Wakely P, West D, Card R, Ibata G, Van Maanen K, Thoren P, Isaksson M, Kerkhofs P. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet Microbiol* 2008; 126: 11-9.
8. Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D, Kibenge FSB. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus 1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Can J Vet Res* 1995; 59: 94-101.

ENGLISH

IMPLEMENTATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND REAL-TIME PCR IN QUICK IDENTIFICATION OF BOVINE HERPESVIRUS 1

N. Milić, J. Nišavić, Ružica Ašanin, Aleksandra Knežević, Jelena Ašanin, D. Vidanović, M. Šekler

Examinations were performed on 65 samples of nasal smears taken from calves and young cows with clinical symptoms of respiratory infection to determine the presence of the bovine herpesvirus 1 using parallel implementation of molecular and standard methods of virological diagnostics. The appearance of a cytopathogenic effect (CPE) was not established in inoculated cell lines 24h, 48h and 72h following inoculation, or after two successive passages of the examined material sample through these cell lines. The application of polymerase chain reaction (PCR) using a primer for glycoprotein B and thymidine – kinase, established the presence of bovine herpesvirus 1 nucleic acid in one

sample of a bovine nasal smear, while the presence of this virus was established in three samples in an examination of the nasal smear samples using the Real-Time PCR method.

Key words: bovine herpesvirus 1, PCR, Real-Time PCR

РУССКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПОЛИМЕРАЗЫ (ЦРП) И МЕТОДЫ *REAL-TIME* ЦРП В БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГОВЯЖЕГО ГЕРПЕСВИРУСА 1

Н. Милич, Й. Нишавич, Ружица Ашанин, Александра Кнежевич, Елена Ашанин, Д. Виданович, М. Шеклер

Совокупно испытывано 65 образчиков носовых мазков, собранных из телят и бычков (тёлок) с клиническими симптомами респираторной инфекции на присутствие говяжьего герпесвируса I сравнительным применением молекулярных и стандартных методов вирусологической диагностики. У инокулированных клеточных линий не установлено явление цитопатогенного эффекта (ЦПЭ-) после 24 ч, 48 ч. и 72 ч. от инокуляции ни после два следующих друг за другом пассажа образчиков испытыванного материала через приведённые клеточные линии. Применением цепной реакции полимеразы (ЦРП) при пользовании праймеров для гликопротеин В и тимидин-киназы, утверждено присутствие нуклеиновой кислоты говяжьего герпесвируса и в одном образчике носового мазка, пока испытыванием приведённых образчиков носовых мазков крупного рогатого скота методом *Real-Time* присутствие упомянутого вируса установлено у трёх образчиков.

Ключевые слова: говяжий герпесвирус I, ЦРП, *Real-Time* ЦРП

**IDENTIFICATION OF HISTAMINIC (H_1 -TYPE) RECEPTORS
IN SMALL INTESTINE OF BROILERS BY APPLICATION OF
HISTAMINE AND SOME OF ITS AGONISTS AND
ANTAGONISTS***

***UTVRĐIVANJE HISTAMINSKIH RECEPTORA H_1 TIPa U TANKOM
CREVU BROJLERA PRIMENOM HISTAMINA I NEKIH NJEGOVIH
AGONISTA I ANTAGONISTA***

Indira Mujezinović, V. Čupić, A. Smajlović, M. Muminović**

Histamine is a biologically active amine (biogenic amine) that has a broad spectra of physiologic and pathologic reactions in the organism. Its effects are shown through 4 types of specific receptors (H_1 , H_2 , H_3 and H_4). Histamine is one of the main causes of intestine disorders and the occurrence of diarrhoea, both of which are very common in broilers. Whilst there is no information in scientific literature about the presence of histaminic receptors in smooth muscles of the small intestine wall of broilers (duodenum, jejunum and ileum), we tried to determine their presence, distribution and type in this kind of muscles. Investigations were carried out on isolated smooth muscles of the circular and longitudinal layer of the broiler small intestine (strip dimension 3-4 mm x 2 cm). The muscle strip was then placed in an isolated organ bath and the contractions obtained were registered with isometric transducers on a two-channel printer.

This was done following the addition of histamine, betahistine (H_1 agonist), and mepiramine (H_1 antagonist). Muscle vitality was checked by adding acetylcholine chloride. Using the obtained results, it can

* Rad primljen za štampu 20. 05. 2010. godine

** Indira Mujezinović, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina; Dr Vitomir Čupić, professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, R Serbia; A. Smajlović, dr sci. med. vet. Mehmed Muminović, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

be concluded that H₁ types of histaminergic receptors are present in smooth muscles of the small intestine of broilers.

Key words: broilers, histamine, histaminic receptors, isolated smooth muscles, small intestine

Introduction / Uvod

Histamine is a basic amine, 2-(4-imidazolyl)-ethyl-amine and its formed from the decarboxylation of the amino acid histidine by a specific enzyme histidine decarboxylase. This enzyme is present in all cell types that contain histamine. Histamine is found in most mammalian tissues, but it is present in a high concentration in the lung, in the skin and in the gastrointestinal tract. At the cellular level, it is found largely in mast cells and basophils, associated with heparin (Adams, 2001; Hadžović and Muminović, 2001), and histaminocytes (non-mast-cell histamine) which occurs in the mucosa of the stomach and in histaminergic neurons in the brain. Histamine has a broad spectra of physiologic and pathologic reactions in the organism. In the presence of histamine different animals have a different reaction. This amine is released from mast cells by exocytosis during inflammatory or allergic reactions, and it is involved in inflammation, anaphylaxis, allergies, it regulates gastric secretion and has a role as a neurotransmitter (Hardmann and Limbird, 2001; Leurs and Timmerman, 2005; Rang *et al.*, 2007).

Histamine produces its action by the effect on specific histamine (H) receptors, which are of the four main types H₁, H₂, H₃ (Ćupić *et al.*, 2007; Hadžović, 2000; Hill *et al.*, 1997; Ramirez, 2003) and H₄ (Hardmann and Limbird, 2001; Rang *et al.*, 2007), and these receptors are present all over the body. H₁-receptors are distributed in a wide variety of tissues including: mammalian brain, smooth muscle from the airways, the gastrointestinal, the genitourinary and the cardiovascular system, adrenal medulla and endothelial cells and lymphocytes (Hadžović and Muminović, 2001; Hill *et al.*, 1997; Ramirez, 2003), and they have a role in allergy (Ramirez, 2003). H₂ receptors are present in the brain, gastric cells, cardiac tissue and in cells of the immune system. Histamine H₂-receptors have a potent effect on gastric acid secretion (Charbon, 1980, Ćupić *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2007). H₂-receptor-mediated smooth muscle relaxation has been documented in airways (Hemming *et al.*, 2000). H₃ receptors have been found in the lung, in several brain regions, (Ćupić *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2007), in the cardiovascular system, in mast cells of the stomach and enterochromaffin cells of the small intestine (Hill *et al.*, 1997). H₄ shows the highest expression in the brain and nervous tissues, in peripheral blood, in the bone marrow and in leukocytes, and moderate expression in spleen, thymus, lung, small intestine, colon and heart (Gantner *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2001).

Histamine appears to be one of the major causes of disturbances of normal intestine function and diarrhoea. This is very often the case in broiler

chicken. The lack of knowledge of the existence of H₁ receptors types in the smooth muscle of the broiler small intestine induced us to try to establish their presence in this tissue using H₁ agonists and antagonists. Our opinion is that the obtained results could be taken as a basis for possible introduction of novel officiant drugs in the therapy of disturbed function of the broiler intestine.

Material and methods / Materijal i metode rada

Acetylcholine, histamine (nonselective agonist of H receptors), betahistine (selective H₁ agonist) and mepiramine (H₁ antagonist) were obtained from the Sigma Chemical Co. (Germany). Poultry (broilers) were obtained from private farms in Bosnia and Herzegovina and acclimatized for about 2-3 days, with food and water available *ad libitum*.

The experiments were performed with the smooth muscle of the circular and longitudinal layers from the broiler small intestine (strip dimension 3-4 mm x 2 cm). Segments were placed in a 10 ml bath for isolated organs filled with Krebs bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 118,4; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1.2 and glucose 11.5; pH 7.3-7.4), gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at cca 40 °C. Tissues were suspended under a resting tension of 2 g and were allowed to equilibrate for 45-60 minutes. Contractions were recorded with an isotonic force transducer (Ugo Basile, 7003, Italy) coupled to a pen recorder (Ugo Basile, 7050). The sensitivity of the tissues to acetylcholine (10⁻⁶ M) was tested before starting the experiments. All experiments were repeated on five to six different preparations obtained from different animals. Segments of small intestine were incubated with histamine, and its agonists, betahistine and dimaprite-dihydrochloride for 1 minute and the time between two applications was 20 minutes. The antagonist mepiramine was added to the bath 3-4 minutes before the agonists.

Results / Rezultati

Results are expressed as percentages of the maximum response (expressed as 100%) produced by histamine on the longitudinal layer of the smooth muscle of broiler duodenum with a histamine concentration of 10⁻³ M.

Histamine (in concentrations of 10⁻⁷ to 10⁻³ M) and betahistine (in concentrations of 10⁻⁵ to 10⁻³ M) induced dose-dependent contraction in the isolated broiler small intestine (duodenum, jejunum and ileum). The circular layer of the smooth muscle of the small intestine showed lower sensitivity to histamine and its agonist betahistine in equal concentrations as in the longitudinal layer (Figures 1, 2 and 3).

In the experiment designed to investigate the effects of the antagonist of H₁ receptor type mepiramine (in concentrations of 10⁻⁶ M and 10⁻⁵ M) antagonized betahistine-induced contraction at a concentration of 10⁻³ M (Figure 4).

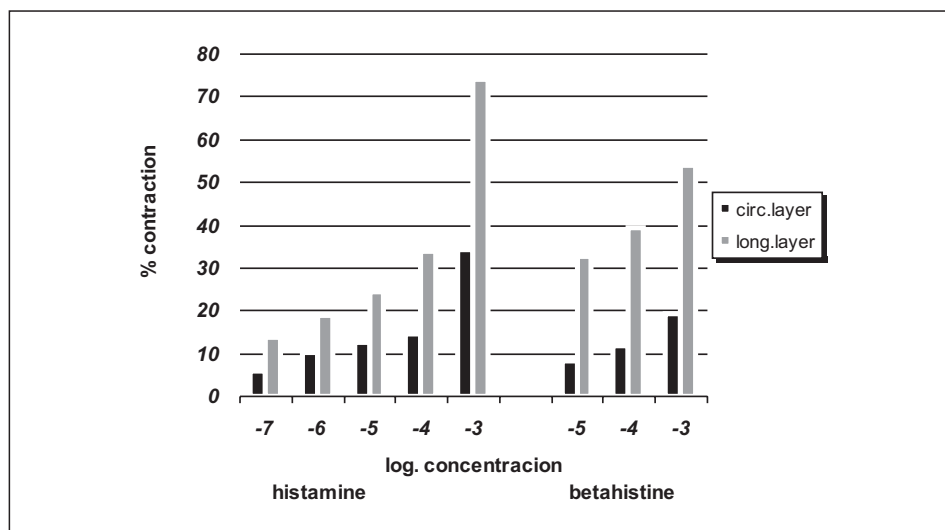


Figure 1. Effect of various concentrations of histamine (10^{-7} - 10^{-3} M) and betahistine (10^{-5} - 10^{-3} M) on circular and longitudinal layer of smooth muscles of broiler duodenum /
Slika 1. Uticaj različitih koncentracija histamina (10^{-7} - 10^{-3} M) i betahistina (10^{-5} - 10^{-3} M) na cirkularni i longitudinalni sloj glatkih mišića u duodenumu brojlera

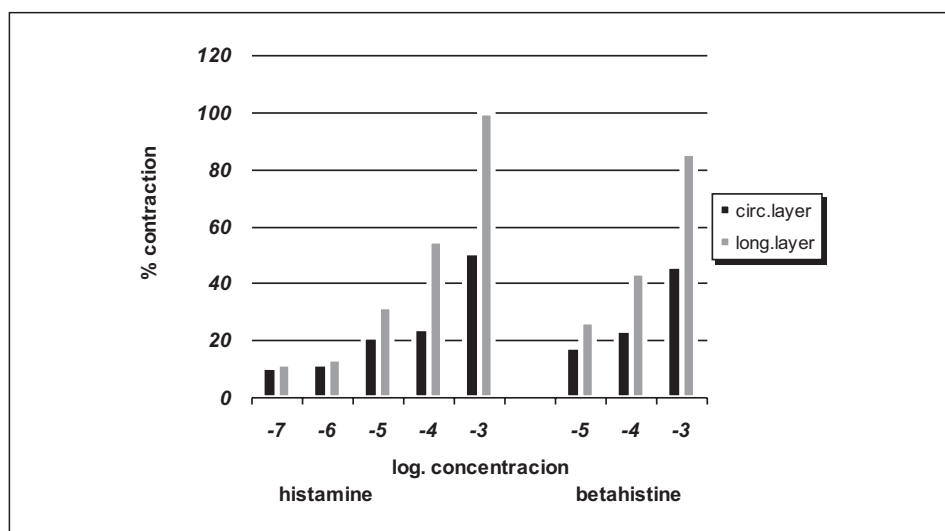


Figure 2. Effect of various concentrations of histamine (10^{-7} - 10^{-3} M) and betahistine (10^{-5} - 10^{-3} M) on circular and longitudinal layer of smooth muscles of broiler jejunum /
Slika 2. Uticaj različitih koncentracija histamina (10^{-7} - 10^{-3} M) i betahistina (10^{-5} - 10^{-3} M) na cirkularni i longitudinalni sloj glatkih mišića u jejunumu brojlera

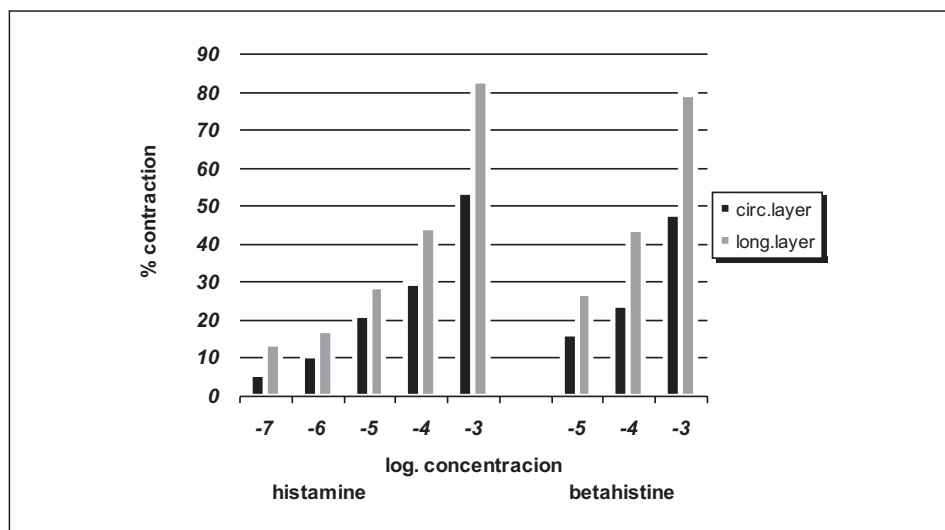


Figure 3. Effect of various concentrations of histamine (10^{-7} - 10^{-3} M) and betahistine (10^{-5} - 10^{-3} M) on circular and longitudinal layer of smooth muscles of broiler ileum /
Slika 3. Uticaj različitih koncentracija histamina (10^{-7} - 10^{-3} M) i betahistina (10^{-5} - 10^{-3} M) na cirkulani i longitudinalni sloj glatkih mišića ileuma brojlera

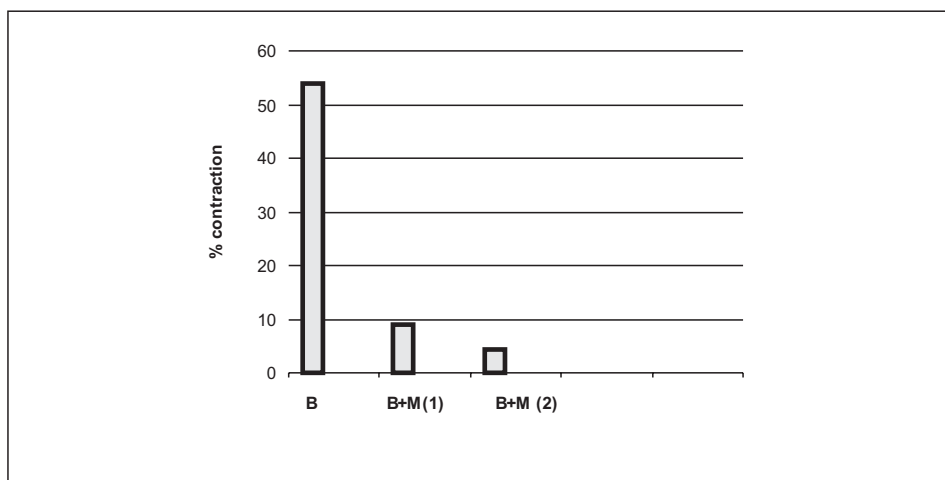


Figure 4. Contractile effect of betahistine (B) on smooth muscles of duodenum alone and in presence of mepiramine (B+M) in concentrations of 10^{-6} M (1) and 10^{-5} M (2) /
Slika 4. Kontraktilni efekat samog betahistina (B) na glatke mišiće duodeuma i u prisustvu mepiramina (B+M) u koncentracijama od 10^{-6} M (1) i 10^{-5} M (2)

Discussion and Conclusion / *Diskusija i zaključak*

In our experiments, the circular layer of the smooth muscle of the broiler small intestine (duodenum, jejunum and ileum) showed considerably lower sensitivity to histamine and betahistine used in equal concentrations as in the longitudinal layer.

In the first part of our experiment we used histamine (non-selective H agonist) in concentrations from 10^{-7} to 10^{-3} M. Using the obtained results, it can be concluded that histaminergic receptors are highly present in the smooth muscle in circular and longitudinal layers of the broiler small intestine. With the increase in concentration, we obtained responses in the form of stronger (higher) intensity contractions, which shows the presence of a dose-response relationship.

In the next part of our experiment, we attempted to find which kind of type H receptors are present in the smooth muscle of circular and longitudinal layers of the broiler duodenum. We used betahistine (H₁ agonist) in concentrations from 10^{-5} to 10^{-3} M. In this *in vitro* study, betahistine evoked dose-dependent contractions on the circular and longitudinal layers of the smooth muscle of the broiler small intestine (duodenum, jejunum and ileum). Longitudinal muscles displayed at least 30% lower sensitivity to the same betahistine concentration than to histamine.

The betahistine effects (at a concentration of 10^{-3} M) on both layers of the duodenum was blocked by mepiramine (H₁ antagonist) at concentrations of 10^{-6} and 10^{-5} M. Using the obtained results, it can be concluded that the H₁ type of receptor is present in the smooth muscle of both layers of the broiler duodenum. We obtained similar results on the other parts of the broiler small intestine (jejunum and ileum).

Summarizing all the effects in this assay, it can be concluded that H₁ type receptors are present in the smooth muscles of the broiler small intestine (duodenum, jejunum and ileum), especially in the longitudinal smooth muscle since this layer reacted with contractions even to a low histamine concentration (10^{-7}). In light of these findings, we suggest that assay substances may have considerable physiological and therapeutic implications in disturbed functions of the small intestine of broilers.

References / *Literatura*

1. Adams RH. Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th edition. The Iowa State University. Press Ames, 2001.
2. Charbon GA, Brouwers HAA, Sala A. Histamin H₁ and H₂ Receptors in the Gastrointestinal Circulation. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol 1980; 312: 123-9.
3. Ćupić V, Muminović M, Kobal S, Velev R. Pharmacology, 1997. Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skopje, Heleta, Beograd.

4. Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank W, Center MW, Bacon K. Histamine H₄ and H₂ Receptors Control Histamine-Induced Interleukin-16 Release from Human CD8⁺ T Cells. *J Pharm Exp Ther* 2002; 303(1): 300-7.
5. Hadžović S. Signal-transduction pathways and their modulation by drugs. *Veterinaria (Sarajevo)* 2000; 49(1-2): 19-50.
6. Hadžović S, Muminović M. *Organofarmakologija domaćih životinja*. Sarajevo, 2001, 1.
7. Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Tenth Edition. The McGraw-Hill Companies. New York, 2001.
8. Hemming JM, Guarraci FA, Firth TA *et al.* Action of histamine on muscle and ganglia of the guinea pig gallbladder. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(3): 622-30.
9. Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H *et al.* International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49(3): 253-78.
10. Leurs R, Timmerman H. Histamine receptors. *Advancing Research for the Life Scientist*. Tocris Review, 2005.
11. Ramirez RMS. New Concept of Histamine Receptors and Action. *Current Allergy and Asthma Reports* 2003; 3: 227-31.
12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Rang and Dale's Pharmacology. Sixth edition. Churchill Livingstone, 2007.
13. Zhu Y, Michalovich D, Wu HL *et al.* Cloning, Expression and Pharmacological Characterization of a Novel Human Histamine Receptor. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 434-41.

SRPSKI

**UTVRĐIVANJE HISTAMINSKIH RECEPTORA H₁ TIPa U TANKOM CREVU
BROJLERA PRIMENOM HISTAMINA I NEKIH NJEGOVIH AGONISTA I
ANTAGONISTA**

Indira Mujezinović, V. Ćupić, A. Smajlović, M. Muminović

Histamin je biološki aktivni amin (biogeni amin) koji ima širok spektar fizioloških i patoloških delovanja u organizmu. Svoje delovanje ispoljava preko četiri tipa specifičnih receptora (H₁, H₂, H₃ i H₄). Histamin je jedan od glavnih uzroka poremećaja funkcije creva i nastanka proliva, koji su kod brojlera česti. Pošto u stručnoj literaturi nema podataka o zastupljenosti histaminskih receptora u glatkoj muskulaturi zida tankog creva (duodenuma, jejunuma i ileuma) brojlera, pokušali smo utvrditi njihovu zastupljenost, distribuciju i vrstu u ovoj muskulaturi. Ispitivanja su vršena na izoliranoj glatkoj muskulaturi cirkularnog i longitudinalnog sloja sva tri dela tankog creva brojlera (strip dimenzija 3-4 mm x 2 cm). Mišićni strip je postavljen u kupatilo za izolirane organe, a izazvane kontrakcije su registrovane na dvokanalnom pisaču izometrijskim transdjuserima, nakon dodavanja histamina, betahistina (H₁ agonist) i mepiramina (H₁ antagonist). Vitalnost glatke muskulature tankog creva brojlera smo proveravali dodavanjem acetilholina. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su histaminergični receptori H₁ tipa zastupljeni u glatkoj muskulaturi sva tri segmenta tankog creva brojlera.

Ključne reči: brojleri, histamin, histaminski receptori, izolovana glatka muskulatura, tanko crevo

**УТВЕРЖДЕНИЕ ГИСТАМИННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Г1 ТИПА В ТОНКОЙ КИШКЕ
БРОЙЛЕРОВ ПРИМЕНЕНИЕМ ГИСТАМИНА И НЕКОТОРЫХ ЕГО АГОНИСТОВ И
АНТАГОНИСТОВ**

Индира Муезинович, В. Чупич, А. Смайлович, М. Муминович

Гистамин биологический активный амин (биогенный амин), имеющий широкий спектр физиологических и патологических действий в организме. Своё действие проявляет через четыре типа специфических рецепторов (Г1, Г2, Г3 и Г4). Гистамин одна из главных причин расстройств функции кишок и становления поносов, которые у бройлеров частые. Так как в специальной литературе нет данных о представленности гистаминовых рецепторов в гладкой мускулатуре стенки токой кишки (двенадцатиперстной, тощей и подвздошной) бройлеров, мы попытались утвердить их представительство, дистрибуцию и вид в этой мускулатуре. Испытания совершены на изолированной гладкой мускулатуре циркулярного и продольного слоях всех трёх частей токой кишки бройлеров (стрип размеров 3-4 мм х 2 см). Мышечный стрип поставлен в ванную для изолированных органов, а вызванные контракции регистрированы на двуканальном писчике изометрическими трансдюсерами, после добавления гистамина, бетагистина (Г1 агонист) и мепирамина (Г1 антагонист). Витальность гладкой мускулатуры тонкой кишки бройлеров мы проверяли добавлением ацетилхолина. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что гистаминергические рецепторы Г1 типа представлены в гладкой мускулатуре всех трёх сегментов тонкой кишки бройлеров.

Ключевые слова: бройлеры, гистамин, гистаминовые рецепторы, изолированная гладкая мускулатура, тонкая кишка

**KOMPARATIVNO ISPITIVANJE EFIKASNOSTI EUGENOLA I
BENZIL-BENZOATA U TERAPIJI ŠUGE OVACA*****INVESTIGATION OF COMPARATIVE EFFICACY OF EUGENOL AND
BENZYL BENZOATE IN THERAPY OF SHEEP MANGE****Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Biljana Radojičić****

Ispitivana je akaricidna efikasnost, podnošljivost i bezbednost eugenola (10 i 20 %) u lečenju sarkoptes-šuge ovaca. Rezultati ispitivanja upoređivani su sa odgovarajućim podacima dobijenim posle primene benzil-benzoata (25 %) primenjivanog na isti način u lečenju šuge ovaca. Tretiranje ovaca je obavljeno tri puta u vremenskom intervalu od po sedam dana. U cilju provere efikasnosti primenjenih lekova uzorci kože su uzimani 7 dana posle svakog tretmana, kao i 28 dana posle trećeg tretmana. Promene na koži izazvane šugarcima su kvantifikovane, na osnovu čega je određivan klinički skor (mean recovery response, MRR). Klinička efikasnost lekova procenjivana je na osnovu povlačenja kliničkih simptoma šuge kao i na osnovu broja prisutnih šugaraca u uzorcima strugotine kože. Eugenol u koncentraciji od 10 % posle prvog tretmana nije imao značajno manju efikasnost u odnosu na veću koncentraciju. Posle drugog tretmana efikasnost eugenola od 20 % bila je statistički značajno veća u odnosu na nižu koncentraciju, što je dokazano i 7 i 28 dana nakon trećeg tretmana. Eugenol je u koncentraciji od 10 % imao statistički značajno veću efikasnost od benzil-benzoata u terapiji šuge ovaca, kako posle prvog, tako i posle drugog i trećeg tretmana. Proverom efikasnosti benzil-benzoata posle 4 nedelje od trećeg tretmana dokazano je da je ona i dalje značajno manja u odnosu na eugenol u koncentraciji od 10 %. Efikasnost eugenola u koncentraciji od 20 % u lečenju sarkoptes-šuge ovaca bila je statistički značajno veća u odnosu na efikasnost eugenola u koncentraciji od 10 %, kao i benzil-benzoat, i posle drugog tretmana i posle 7 i 28 dana posle trećeg tretmana. Tokom trokratne primene eugenola u koncentraciji od 10 i 20 % i benzil-benzoata u koncentraciji od 25 % nisu zapaženi

* Rad primljen za štampu 13. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Milanka Jezdimirović, redovni profesor, dr sci. med. vet. Nevenka Aleksić, redovni profesor, dr sci. med. vet. Biljana Radojičić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, R Srbija

bilo kakvi znaci lokalne i sistemske nepodnošljivosti kod tretiranih ovaca.

Ključne reči: eugenol, benzil-benzoat, šuga, Sarcoptes scabiei, ovce

Uvod / Introduction

Šuga se svrstava u grupu najznačajnijih parazitskih infekcija ovaca, kako po učestalosti pojave i broju životinja koje su inficirane, tako i po težini kliničkih manifestacija. Razlikuju se sarkoptes-šuga prouzrokovana vrstom *Sarcoptes scabiei*, psoroptes-šuga koju izaziva *Psoroptes ovis* i horioptes-šuga, čiji je uzročnik *Chorioptes bovis* (Hosie, 2010; Taylor i sar., 2007; Aleksić, 2009).

Za preveniranje i lečenje šuge kod ovaca koriste se brojni lekovi različitih hemijskih grupa, na primer organofosfati (diazinon), avermektini (ivermektin, doramektin), milbemicini (milbemicin, milbemicin-oksime, moksidektin) i sintetski piretroidi (permetrin, cipermetrin, deltametrin, fenvalerat) (O'Brien i sar., 1996; Sekar i sar., 1997; O'Brien i sar., 1999; Fthenakis i sar., 2000; Byron i Lindsay, 2001; Jezdimirović, 2010). Mnogi od ovih lekova imaju nisku selektivnu toksičnost, nedovoljnu biocidnu aktivnost ili su izazivači parazitoza manje osetljivih ili rezistentnih na neke od njih. Određeni predstavnici ektoantiparazitika ne primenjuju se kod životinja čije se meso i mleko koriste za ishranu ljudi jer za njih nije ustanovljen maksimalni nivo rezidua (MRL) u mesu i mleku (fipronil, propoksur) ili je njihova primena u ove svrhe zabranjena (lindan, karbaril). To su razlozi zbog kojih se intenzivno radi na sintezi i ispitivanju lekovitih supstanci biljnog porekla sa potencijalnim ektocidnim dejstvom koje bi se moglo iskoristiti u terapiji ektoparazitoza kod farmских životinja. Bilo je pokušaja lečenja i preveniranja šuge eteričnim uljima poreklom od različitih biljaka (Fajimi i Taiwo, 2005): *Eugenia caryophyllata* (karanfilić) (Jezdimirović i sar., 2006), *Cedrus deodara* (kedar) (Sharma i sar., 1997), *Cinnamomum zeylanicum* (cimet) (Fichi i sar., 2007), *Azadirachta indica* (nim) (Tabassama i sar., 2008), *Vitellaria paradoxa* (vrsta tropske drvenaste biljke) (Fajimi i sar., 2002b), *Aloe variegata* (Fajimi i sar., 2002a).

S obzirom na to da smo našim ranijim ispitivanjima dokazali zadovoljavajuću efikasnost i bezbednost eugenola u terapiji šuge svinja (Jezdimirović i sar., 2006), želeli smo da ih ispitamo i kod šuge ovaca prouzrokovane *Sarcoptes scabiei* var. *ovis*.

Materijal i metode / Material and methods

Ogled je izveden na ukupno 24 ovce, meleza dobijenih ukrštanjem svrljiškog soja pramenke i rase merino, starosti od jedne do tri godine, poreklom sa privatne farme u okolini Merošine. Životinje su držane u ovčarnicima.

Ovce kod kojih je ustanovljena infekcija izdvojene su iz stada i podeljene u četiri grupe od po šest životinja metodom slučajnog izbora, bez obzira na broj mesta i veličinu površine kože zahvaćene šugom. Kontakt između pojedinih grupa inficiranih životinja bio je onemogućen. Identitet svake pojedinačne ovce utvrđivan je na osnovu broja na ušnoj markici.

U cilju provere efikasnosti eugenola i benzil-benzoata i statističke obrade podataka neophodno je bilo da se promene na koži izazvane šugarcima kvantifikuju, odnosno da se dobije klinički skor. U tu svrhu primenjena je skala po Sharma i sar. (1997).

Kod inficiranih ovaca registrovane su sledeće promene:

- 1 - crvenilo kože sa intenzivnim svrabom;
- 2 - odsustvo krasta, vlažne lezije sa obilnom eksudacijom;
- 3 - suve lezije sa krastama i gubitkom dlake;
- 4 - zadebljala, naborana koža sa hiperkeratinizacijom.

Kod tretiranih ovaca registrovane su sledeće promene:

- 1 - nepromenjeno stanje;
- 2 - suve lezije i odsustvo češanja;
- 3 - početak smanjivanja lezija i rasta dlake;
- 4 - značajan rast dlake, glatka koža;
- 5 - kompletan oporavak.

Strugotina kože uzimana je skalpelom sa više promenjenih mesta na glavi, ušima, aksilama i preponama ovaca suspektnih na sarkoptes-šugu. Uzorkovanje strugotine kože obavljeno je ukupno pet puta, odnosno prvi put (u cilju dijagnostike šuge) dva dana pre aplikacije lekova, 7, 14, 21. i 42. dana (četiri nedelje od poslednje aplikacije).

Uzorci za pregled dobijeni su struganjem kože sa granice između promenjenih i zdravih mesta (ukupno tri mesta na svakoj ovci), sa površine od 3 cm² (Fthenakis i sar., 2001). Na skalpel je prethodno bila naneta manja količina glicerina da bi se sprečilo rasipanje sakupljenog materijala. Koža je strugana do prve pojave kapljica krvi. Uzorci su pregledani u roku od 6 h od uzimanja, metodom kuvanja (KOH i destilovana voda). Posle 10 minuta centrifugiranja, sediment je suspendovan u destilovanoj vodi, ponovo centrifugovan i sediment pregledan svetlosnom mikroskopijom (uveličanje 100 puta). Na osnovu prisustva *Sarcoptes scabiei* var. *ovis* postavljena je dijagnoza. Determinacija vrste urađena je na osnovu morfometrijskih osobina akarina.

Klinička efikasnost eugenola i benzil-benzoata u lečenju sarkoptes-šuge ovaca procenjavana je na osnovu povlačenja kliničkih simptoma šuge (mean recovery response, MRR), kao i na osnovu broja prisutnih šugaraca u uzorcima strugotine kože. MRR je određivan na osnovu prosečne vrednosti kliničkog skora dobijenog kod inficiranih, odnosno tretiranih ovaca svake grupe. Efikasnost tretmana procenjavana je na osnovu formule (Khan i sar., 1998):

$$ET(\%) = \frac{\text{br. šugarca pre tretmana} - \text{br. šugarca posle tretmana} / \text{number of mites before treatment} - \text{number of mites after treatment}}{\text{br. šugarca pre tretmana} / \text{number of mites before treatment}} \times 100$$

Svi inficirani delovi tela ovaca (glava, uši, aksilarni i ingvinalni predeo) pre nanošenja lekova najpre su ošišani i natopljeni mlakom vodom. Posle sušenja (oko 10 min) ovi delovi tela su prskani do potpunog kvašenja ispitivanim emulzijama lekova. Za svaku životinju utrošeno je od 50 do 100 ml emulzije. Ispitivanje efikasnosti eugenola i benzil-benzoata u lečenju sarkoptes-šuge ovaca obavljeno je trokrotnom aplikacijom emulzija akaricida u razmaku od 7 dana. Ovce su tretirane 0, 7. i 14. dana oglada.

Prva grupa ovaca bila je kontrolna i tretirana je vehikulumom (2 % tečnog parafina i 98 % fiziološkog rastvora natrijum-hlorida).

Drua grupa ovaca tretirana je emulzijom eugenola u koncentraciji od 10 %, prskanjem promenjenih mesta na koži pomoću plastičnih prskalica.

Treća grupa prskana je emulzijom eugenola u koncentraciji od 20 % na isti način.

Četvrta grupa ovaca tretirana je emulzijom benzil-benzoata (25 %).

Tretiranje je obavljeno 10 % i 20 % rastvorom eugenola (Eugenol 98 % sol, Sigma-Aldrich). Rastvor eugenola dobijen je mešanjem 10, odnosno 20 ml etanolnog rastvora eugenola sa odgovarajućom količinom emulzije koja se sastoji od 2 % tečnog parafina i 98 % fiziološkog rastvora natrijum-hlorida.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Benzil-benzoat je primenjen u obliku emulzije gotovog preparata Ascabiol 25 % (Aventis Pharma Ltd, Velika Britanija).

Težina kliničke slike sarkoptes-šuge ispitivanih ovaca u svim grupama bila je približno ista. U Tabeli 1 prikazane su prosečne vrednosti promena izazvanih šugarcima, izražene na osnovu skale po Sharma i sar. (1997).

Tabela 1. Prosečne vrednosti parametara za procenu težine kliničkih simptoma sarkoptes-šuge ovaca (prema skali Sharma i sar., 1997) /

Table 1. Average values of parameters for evaluating clinical symptoms of sarkoptes-mange in sheep (according to Sharma et al., 1997)

Grupa / Group	Tretman / Treatment	Srednja vrednost kliničkog skora ± SD / Mean value of clinical score ± SD
Kontrola / Control	Vehikulum / Vehicle	3,42±0,80
I grupa / Group I	Eugenol 10 %	3,08±0,90
II grupa / Group II	Eugenol 20 %	3,00±1,00
III grupa / Group III	Benzil-benzoat / Benzyl-benzoate 25 %	3,33±0,57

Razlike u numeričkim vrednostima dobijene procenjivanjem kliničkih parametara težine kliničke slike sarkoptes-šuge ovaca između pojedinih grupa ovaca nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

U kontrolnoj grupi ovaca klinička slika šuge nije se značajno promenila tokom perioda posmatranja.

U grupi ovaca tretiranih eugenolom u koncentraciji od 10 % posle prve aplikacije, vrednost MRR iznosila je $1,50\pm0,37$, a efikasnost 52,0 %. Očigledno je da jednokratna primena eugenola u koncentraciji od 10 % ima minimalnu efikasnost u terapiji sarkoptes-šuge ovaca. Vrednost MRR posle druge aplikacije ove koncentracije eugenola bila je nešto veća u odnosu na prethodnu ($2,00\pm0,42$) (65,5 %, Tabela 2), što važi i za efikasnost tretmana (Tabela 3). Sedam dana posle treće primene eugenola (21. dan) došlo je do daljeg poboljšanja kliničke slike šuge ($MRR=2,66\pm0,23$), a efikasnost trokrotnog tretmana eugenolom iznosila je 84,0 %. Četiri nedelje posle poslednje primene eugenola u koncentraciji od 10 % klinički skor je bio najveći u poređenju sa prethodna tri ($3,56\pm0,58$), kao i efikasnot lečenja (89,6 %). Jednokratna i dvokratna primena eugenola u koncentraciji od 10 % ne daje zadovoljavajuću efikasnost. Tek nakon treće primene ispitivana koncentracija daje relativno zadovoljavajuću efikasnost, koja je statistički značajno veća u poređenju sa efikasnošću benzil-benzoata (25 %), kako posle nedelju dana, tako i posle četiri nedelje od poslednje, treće, primene. Primetno je da se sa ponavljanjem tretmana povećava efikasnost eugenola u lečenju sarkoptes-šuge.

Tabela 2. Prosečne vrednosti parametara za procenu povlačenja kliničkih simptoma sarkoptes-šuge ovaca posle primene lekova (MRR, prema skali Sharma i sar., 1997) / *Table 2. Average values of parameters for evaluating withdrawal of clinical symptoms of sarcoptes-mange in sheep following drug application (MRR, according to Sharma et al., 1997)*

Grupa / Group	7. dan / 7th day	14. dan / 14th day	21. dan / 21st day	42. dan / 42nd day
Kontrola / <i>Control</i>	$0,00\pm0,00$ a	$0,12\pm0,00$ a	$0,33\pm0,15$ a	$0,48\pm0,40$ a
I	$1,50\pm0,37$ b	$2,00\pm0,42$ b	$2,66\pm0,23$ b	$3,56\pm0,58$ b
II	$1,85\pm0,50$ b	$3,41\pm0,45$ c	$3,89\pm0,25$ c	$4,00\pm0,00$ c
III	$0,87\pm0,12$ c	$1,00\pm0,25$ d	$2,00\pm0,16$ d	$2,62\pm0,22$ d

Razlike između srednjih vrednosti označenih istim slovom u svakoj pojedinačnoj koloni nisu statistički značajne ($P>0,05$) / *Differences between mean values marked with same letter in each individual column are not statistically significant ($P>0,05$)*

Značajno bolja efikasnost u lečenju šuge posle prvog tretmana postignuta je primenom eugenola u koncentraciji od 20 %, u poređenju sa 10 % koncentracijom eugenola i benzil benzoatom. Posle drugog tretmana eugenola u višoj koncentraciji (20 %) MRR iznosio je $3,41\pm0,45$, a efikasnost 90,5 %. Efikasnost eugenola primenjenog u višoj koncentraciji bila je značajno veća u poređenju sa nižom, kao i sa benzil-benzoatom. Sedam dana od poslednjeg tretmana (21. dan oglada), MRR je dostigao vrednost od $3,89\pm0,25$, a klinička efikasnost

eugenola (20 %) iznosila je 100 %, što su bili signifikantno bolji rezultati u lečenju šuge ovaca u odnosu na rezultate dobijene posle primene niže koncentracije eugenola ili benzil-benzoata. Četiri nedelje posle trećeg tretmana (42. dan) efikasnost eugenola u koncentraciji od 20 % ostala je nepromenjena, a MRR je iznosio maksimalnih $4,00 \pm 0,00$.

Tabela 3. Efikasnost eugenola u koncentraciji od 10 i 20 % i benzil-benzoata u koncentraciji od 25 % u lečenju sarkoptes-šuge ovaca /

Table 3. Efficacy of eugenol in concentrations of 10 and 20 % and benzyl-benzoate in a concentration of 25 % in treatment of sarcoptes-mange in sheep

Grupa / Group	7. dan / 7th day	14. dan / 14th day	21. dan / 21st day	42. dan / 42nd day
I (eugenol 10 %) / I (eugenol 10 %)	52,0 %	65,5 %	84,0 %	89,6 %
II (eugenol 20 %) / II (eugenol 20 %)	78,6 %	90,5 %	100,0 %	100,0 %
III (benzil-benzoat 25 %) / III (benzyl-benzoate 25 %)	49,8 %	62,3 %	82,7 %	88,7 %

Tokom ponavljane primene eugenola u koncentraciji od 10 i 20 % i benzil-benzoata u koncentraciji od 25 % nisu zapaženi znaci lokalne i sistemske toksičnosti kod tretiranih ovaca.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata ispitivanja akaricidne efikasnosti eugenola u koncentraciji od 10 i 20 % u terapiji sarkoptes-šuge ovaca može se zaključiti sledeće:

Eugenol u koncentraciji od 10 % posle prvog tretmana sarkoptes-šuge ovaca nema značajno manju efikasnost u odnosu na veću koncentraciju. Posle drugog tretmana efikasnost eugenola u koncentraciji od 20 % je statistički značajno veća u odnosu na nižu koncentraciju, što je dokazano i 7 i 28 dana od trećeg tretmana.

Poređenjem efikasnost benzil-benzoata u koncentraciji od 25 % sa eugenolom u koncentraciji od 10 % može da se zaključi da eugenol ima statistički značajno veću efikasnost u terapiji šuge ovaca, kako posle prvog, tako i posle drugog i trećeg tretmana. Proverom efikasnosti benzil-benzoata posle četiri nedelje od trećeg tretmana može da se zaključi da je ona i dalje značajno manja u odnosu na eugenol u koncentraciji od 10 %.

Efikasnost eugenola u koncentraciji od 20 % u lečenju sarkoptes-šuge ovaca bila je statistički značajno veća u odnosu na eugenol primenjen u koncentraciji od 10 %, kao i benzil-benzoat posle drugog tretmana i 7 i 28 dana nakon trećeg tretmana.

Tokom trokratne primene (u vremenskim intervalima od po sedam dana) eugenola u koncentraciji od 10 i 20 % i benzil-benzoata u koncentraciji od 25 % nisu zapaženi bilo kakvi znaci lokalne i sistemske nepodnošljivosti kod tretiranih ovaca.

Aktivni sastojak eteričnog ulja, eugenol, ima prednost nad benzil-benzoatom u terapiji sarkoptes-šuge ovaca jer je pokazao značajno bolju efikasnost, zbog čega može da se preporuči kao jedan od ektocida za kontrolu i lečenje ovog oblika šuge.

Literatura / References

1. Aleksić N. Šuga, U: Parazitske bolesti, specijalni deo, Beograd, 2010.
2. Byron LB, Lindsay DL. Ectoparasiticides, In: Adams R. Veterinary pharmacology and therapeutics, Iowa State University Press, 2001: p. 1017-40.
3. Fajimi AK, Ayodeji IO, Ajayi FT, Ogundola FI. Efficacy studies of topically administered aloe-vera in rabbits naturally infested with psoroptic mange mites. Moor J Agric Res 2002a; 3(2): 199-202.
4. Fajimi AK, Taiwo AA, Adebawale EA, Ogundola EA. Evaluation of sheabutter plus salt against naturally acquired psoroptic mange in rabbits. Trop Veterinarian. 2002b; 20(1): 11-6.
5. Fajimi AK, Taiwo AA. Herbal remedies in animal parasitic diseases in Nigeria: a review. Afr J Biotechnol 2005; 4(4): 303-7.
6. Fichi G, Flamini G, Zaralli LJ, Perucci S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. Phytomedicine 2007; 14(2-3): 227-31.
7. Fthenakis GC, Karagiannidisb A, Alexopoulos C, Brozosa C, Papadopoulos E. Effects of sarcoptic mange on the reproductive performance of ewes and transmission of *Sarcoptes scabiei* to newborn lambs. Vet Parasitol 2001; 95: 63-71.
8. Fthenakis GC, Papadopoulos E, Himonas C, Leontides L, Kritas S, Papatsas J. Efficacy of moxidectin against sarcoptic mange and effects on milk yield of ewes and growth of lambs. Vet Parasitol 2000; 87: 207-16.
9. Hosie B. Sheep Scab Checklist, <http://www.sac.ac.uk/mainrep/pdfs/sheepscabchecklist.pdf>, Accessed 03.03.2010
10. Jezdimirović M, Kulišić Z, Aleksić N, Bjelić N, Ivanović S. Efikasnost eugenola u lečenju šuge svinja. Veterinarski glasnik 2006; 60(1-2): 33-42.
11. Jezdimirović M. Veterinarska farmakologija, IV izdanje, Beograd, 2010.
12. Khan MN, Hayat CS, Iqbal Z. Evaluation of acaricidal efficacy of Ivermectin, Diazinon, Permethrin and Coumaphos in cattle and buffaloes. Pakistan Entomol 1998; 19: 58-60.
13. O'Brien DJ, Forbes AB, Pittb SR, Baggott DG. Treatment and prophylaxis of psoroptic mange (sheep scab) using an ivermectin intraruminal controlled-release bolus for sheep. Vet Parasitol 1999; 85(1): 79-85.
14. O'Brien D, Parker LD, Menton C, Keaveny C, McCollum E, O'Laoide S. Treatment and control of psoroptic mange (sheep scab) with moxidectin. Vet Rec 1996; 139: 437-9.
15. Sekar M, Kulkarni VV, Gajendran K. Efficacy of ivermectin against sarcoptic mange in sheep. Indian Vet J 1997; 74: 75-6.

16. Sharma DK, Saxena VK, Sanil NK, Singh N. Evaluation of oil of Cedrus deodara and benzyl benzoate in sarcoptic mange in sheep. Small Ruminant Res 1997; 26: 81-5.
17. Tabassama SM, Iqbala Z, Jabbara A, Sindhua ZD, Chatthab AI. Efficacy of crude neem seed kernel extracts against natural infestation of *Sarcoptes scabiei* var. ovis. J Ethnopharmacol 2008; 115(2): 284-7.
18. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Parasites of sheep and goats. In: Veterinary parasitology, 3rd Ed, Blackwell Publishing, 2007. p. 152-258.

ENGLISH

INVESTIGATION OF COMPARATIVE EFFICACY OF EUGENOL AND BENZYL BENZOATE IN THERAPY OF SHEEP MANGE

Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Biljana Radojičić

The acaricide efficacy, tolerance and safety of eugenol (10 and 20 %) in the treatment of sarcoptic mange in sheep have been investigated. The results were compared with those corresponding for benzyl benzoate (25 %), which was applied to sheep in the same way. The treatment was applied on sheep three times in one-week intervals. Skin scrapings were sampled seven days after each treatment, as well as twenty-eight days following the third one. The changes on the skin were quantified and the mean recovery response (MRR) was calculated. The clinical efficacy was assessed according to the MRR and the number of mites in the samples. Following the first treatment 10 % eugenol was not significantly less efficacious in comparison with the higher concentration. Having been applied twice 20 % eugenol was significantly more efficacious when compared to the lower concentration, which remained the same seven and twenty-eight days after the third application. The efficacy of 10 % eugenol in the therapy of mange was significantly higher in comparison with benzyl benzoate following one, two or three administrations. The efficacy of benzyl benzoate four weeks after the third treatment was still significantly lower in comparison with 10 % eugenol. The efficacy of 20 % eugenol was significantly higher in comparison with its lower concentration as well as that of benzyl benzoate, following the second, and seven and twenty-eight days after the third one. No signs of local or systemic intolerance were observed in sheep treated with either 10 or 20 % eugenol, or 25 % benzyl benzoate.

Key words: eugenol, benzyl benzoate, mange, *Sarcoptes scabiei*, sheep

РУССКИЙ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭУГЕНОЛА И БЕНЗИЛ-БЕНЗОАТА В ТЕРАПИИ ПАРШИ ОВЕЦ

Миланка Ездимирович, Невенка Алексич, Биляна Радоичич

Испытана акарицидная эффективность, сносность и безопасность эугенола (10 и 20%) в лечении саркопте-парши овец. Результаты испытания срав-

ниваны с отвечающими данными, полученными после применения бензил-бензоата (25% применённого на такой же способ в лечении парши овец. Лечение овец сделано три раза в временном интервале от по семи дней. С целью проверки эффективности применённых лекарств образчики кожи брали семь дней после каждого лечения, словно и 28 дней после третьего лечения. Изменения на коже, вызванные чесоточными клещами количественные, на основе чего определялось клиническое число очков (mean recovery response, MRR). Клиническая эффективность лекарств оценивана на основе ухода клинических симптомов парши словно и на основе числа, присутствующих чесоточных клещей в образчиках стружки кожи. Эугенол в концентрации от 10% после первого лечения не имеет значительно более маленькую эффективность в отношении большей концентрации. После второго лечения эффективность эугенала от 20% была статистически значительно больше в отношении более низкой концентрации, что доказано и 7 и 28 дней от третьего лечения. Эугенол в концентрации от 10% имел статистически значительно более большую эффективность от бензил-бензоата в терапии парши овец, как после первого, так и после второго и третьего лечения. Проверкой эффективности бензил-бензоата после четырёх недель от третьего лечения доказано, что она и дальше значительно более маленькая в отношении эугенала в концентрации от 10%. Эффективность эугенала в концентрации от 20% в лечении саркопте-парши овец была статистически значительно более большая в отношении эффективности эугенала в концентрации от 10%, словно и бензил-бензоат, и после второго лечения и после 7 и 28 дней от третьего лечения. В течение троекратного применения эугенала в концентрации от 10 и 20% и бензил-бензоата в концентрации от 25% не замечены хоть какие-нибудь знаки местной и системной непереносимости у леченных овец.

Ключевые слова: эугенол, бензил-бензоат, парша, *Sarcoptes scabiei*, овцы

A RETROSPECTIVE STUDY OF PERITONEAL FLUIDS IN COWS WITH ABDOMINAL DISORDERS*

RETROSPEKTIVNA STUDIJA PERITONEALNIH TEČNOSTI KOD KRAVA SA POREMEĆAJIMA ABDOMENA

T. Zadnik**

At the Clinic for Ruminants in Ljubljana, an investigation of peritoneal fluid in cows that stretched over 30 years was conducted. A total of 779 cows were studied; 444 had hardware disease, 212 had left abomasal displacement, 98 cows had right abomasal displacement with or without abomasal torsion, and 25 cows had problems with the uterus. Abdominocentesis, macroscopic and microscopic examination of peritoneal fluid (physical appearance, differentiation to transudate/exudate, cytological characteristics) offered valuable diagnostic information. On the basis of the results of 779 laboratory examinations, we have come to the conclusion that abdominal fluid is of significant diagnostic, therapeutic and prognostic value for several acute and chronic abdominal diseases.

Key words: abdominocentesis, abdominal disorders, cow, peritoneal fluid

Introduction / Uvod

Abdominal problems are one of the most important diseases in cattle around the world and also in Slovenia (Radostits *et al.*, 2007; Zadnik and Jazbec, 1996). Clinicians pay them special attention. At our Clinic, we have always supported surgical treatment (clinical-laparorumenotomy) of abdominal disorders (Zadnik and Jazbec, 1996). Most diagnoses are made after a clinical examination and history taking. Coupled with a conscientious history, the physical examination will permit a relatively accurate diagnosis in most abdominal problems. Laboratory tests and other ancillary examinations are best viewed as adjuncts to traditional, low technology diagnostic approaches (Radostits *et al.*, 2000; 2007). Ab-

* Rad primljen za štampu 24. 03. 2010. godine

** Prof. dr. Zadnik Tomaž, DVM, University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Clinic for Ruminants, Ljubljana, Slovenia

dominocentesis (abdominal paracentesis) is a surgical puncture into the abdominal cavity for the aspiration of fluid. Abdominocentesis of the abdomen includes obtaining a sample of peritoneal fluid when peritonitis or inflammation of serosae of the intestines or other viscera of the abdomen is suspected (Oehme and Moorsdy, 1970; Radostits *et al.*, 2000; 2007). Peritoneal fluid reflects the pathophysiological state of the parietal and visceral mesothelial surfaces of the peritoneum (Hosgood and Salisbury, 1989; Radostits *et al.*, 2007; Zadnik, 2000). Furthermore, it is of vital importance in the diagnosis of abdominal disorders in cows (Frame and Cert, 1997; Zadnik, 2000; Wilson *et al.*, 1985). Today, abnormal peritoneal fluid in cows is a highly sensitive indicator of peritoneal diseases, but not a good indicator of the nature of the diseases (Anderson *et al.*, 1995; Kopcha and Schultze, 1991; Radostits *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1985).

The use of abdominal fluid as an aid to diagnose abdominal diseases has been well documented (Hanson *et al.*, 1992; Hosgood and Salisbury, 1989; Oehme and Moorsdy, 1970; Radostits *et al.*, 2000; 2007). A normal small quantity of peritoneal fluid in the abdomen of an adult cow does not mean that the carrying out of abdominocentesis has no diagnostic value. Peritoneal fluid changes quantitatively as well as qualitatively, especially in more serious diseases of abdominal organs (Hirsch and Townsend, 1982; Hosgood and Salisbury, 1989; Oehme and Moorsdy, 1970). There is also extensive description of normal bovine peritoneal fluid (Anderson *et al.*, 1995; Radostits *et al.*, 2007). Healthy and not pregnant cows have about 15–20 ml of peritoneal fluid (Anderson *et al.*, 1995; Oehme and Moorsdy, 1970). Normal peritoneal fluid is amber and crystal clear – transudate (Hirsch and Townsend, 1982; Radostits *et al.*, 2000; 2007). Peritoneal fluid analysis was a very useful aid in clinical examinations and the correct diagnosis of abdominal disorders, especially if it was not possible to carry out blood tests (Oehme, 1969; Radostits *et al.*, 2000).

In cows, the choice of sites for abdominocentesis is a problem because the rumen covers such a large portion of the ventral abdominal wall and avoiding its penetration is difficult. The most profitable sites are those that, on an anatomical basis, consist of recesses between the fore stomachs, abomasum, diaphragm and liver. These are usually caudal to the xyphoid sternum and 4 – 10 cm lateral to the midline (Radostits *et al.*, 2000; 2007; Wilson *et al.*, 1985).

The aim of this paper was to present the results of a retrospective study of peritoneal fluid. Examinations of cows with abdominal disorders were carried out in our Clinic according to our routine procedure of left or right exploratory laparotomy (Zadnik *et al.*, 1992). Our collection technique, physical evaluation and fast laboratory analysis of abdominal fluids in cows with most frequently abdominal disorders have been described.

Material and methods / *Materijal i metode rada*

All abdominal fluid samples ($n = 779$) collected from the clinical cases admitted to the Clinic for Ruminants of the Veterinary Faculty (Slovenia) during the years 1976 to 2009 were retrospectively analyzed. All samples collected have been subsequently subjected to the routine clinical method according to left or right side exploratory laparotomy (Zadnik *et al.*, 1992).

Techniques for collection of abdominal fluid /

Tehnike za sakupljanje abdominalne tečnosti

The choice of region for abdominocentesis and the technique for collection of fluid we used were described by Kopcha and Shcultze (1991), Zadnik (2000) and Radostits *et al.* (2000; 2007). Fluid was collected from the cows in a standing position, restrained with nose tongs and a lift-grip of the tail. According to the history of the disease and the clinical signs, we carried out abdominocentesis in two regions.

1. The right cranio-ventral region is located 4–8 cm caudal from the xyphoid sternum and 5 to 8 cm lateral and right from the midline.

2. The left cranio-ventral region is located 4–8 cm caudal from the xyphoid sternum and 5 to 8 cm lateral and left from the midline.

Preparation of the abdominocentesis region was clipped; the skin is prepared aseptically and surgically prepared. For abdominocentesis we used with care and caution a 16 gauge and 5 cm hypodermic needle. The needle is pushed carefully and slowly through the abdominal wall, which will twitch when the peritoneum is punctured. Fluid may drip from the cannula or it may be necessary to connect a syringe to apply a vacuum. It may be necessary to move the cannula back and front in a few different directions before fluid is obtained. The fluid obtained was collected in a small tube containing ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), to avoid clotting and analyzed about 10 minutes after collation.

Laboratory evaluation of abdominal fluid /

Laboratorijska evaluacija abdominalne tečnosti

Three parameters of the abdominal fluid were examined: (a) physical appearance (b) differentiation to transudate or exudate and (c) cytological characteristics.

- a. With physical appearance of abdominal fluid, its color, transparency, density and smell were evaluated. The fluid density was determined with a hand refractometer.

- b. The differentiation of peritoneal fluid on transudate or exudate was made by Rivalta test (Marek and Mocsy, 1956; Žemva and Žemva Mimica, 1960).

c. Peritoneal fluid cytology was evaluated with a microscopic examination. The droplet of the original fluid sample was covered with micro cover glass and examined by microscopy (10x40) to present mesothelial cells, red blood cells, leukocytes and bacteria.

Classification of peritoneal fluids / Klasifikacija peritonealnih tečnosti

The results of these three analyses were classified in six categories (Table 1):

1. Negative or normal findings (-): fluid is transudate, crystal clear to pale yellow in color, without odor, specific gravity 1.005 do 1.015; in the course of the microscopic examination of droplet native peritoneal fluid we did not find mesothelial cells, red blood cells, lymphocytes, neutrophils and bacteria; the Rivalta test for differentiation of peritoneal fluid to transudate or exudate was negative.

2. Suspected findings – weak inflammation ($\pm$): fluid is transudate, pale yellow in color, without odor; during the microscopic examination of droplet of native fluid we found single mesothelial cells, red blood cells, lymphocytes, neutrophils and bacteria; the Rivalta test was negative.

3. Positive findings – moderate inflammation (+); is exudate, amber to turbid yellow color fluid, specific gravity >1.025 , during the microscopic examination of droplet of native fluid we found from 2 to 4 lymphocytes or leukocytes, single blood cells and bacteria; the Rivalta test showed suspected findings.

4. Positive findings – inflammation ($++$); fluid is exudate: turbid amber to pink in color, specific gravity from 1.025 to 1.055, during the microscopic examination of droplet of native fluid we found from 4 to 10 lymphocytes or neutrophils, 5 to 8 red blood cells, some mesothelial cells and bacteria. The Rivalta test was positive.

5. Strong positive findings - severe inflammation ($+++$); serous sanguineous, turbid, pus, viscous fluid with fibrin, specific gravity >1.055 , during the microscopic examination of droplet of native fluid we found from 8 to 15 lymphocytes or leukocytes, few mesothelial cells, red blood cells and bacteria; the Rivalta test was strongly positive.

6. Useless; full blood, rumen fluid, amnion or allantoic fluid.

Results / Rezultati

Table 1 shows the results of the retrospective study of abdominal fluids in cows with abdominal disorders. The examination of the cows was carried out at our Clinic from 1979 to 2009. Definitive diagnosis was determined after routine exploratory laparotomy.

Table 1. Results of peritoneal fluid examination associated with the diagnosis of the diseases of cows (n = 779) admitted to the Clinic for Ruminants in 1979 – 2009 /
Tabela 1. Rezultati ispitivanja peritonealne tečnosti u vezi sa dijagnozom bolesti krava (n = 779) primljenih na Kliniku za preživare tokom 1979 – 2009.

Diagnosis / Dijagnoza (n = 759)	Number and % of cows / Broj i % krava	% of negative fluid / % negativne tečnosti (-)	% of suspect fluid (±) Weak inflammation / % sumnjive tečnosti (±) Blaga upala	% of positive fluid (+) Moderate inflammation / % pozitivne tečnosti (+) Umerena upala	% of positive fluid (++) Inflammation / % pozitivne tečnosti (++) Upala	% of strong positive fluid (+++) Severe inflammation / % snažno pozitivne tečnosti (+++) Jaka upala	% of useless / % neupotrebljivih
Foreign body ¹ / Strano telo ¹	444 (55.9%)	1.7	3.1	13.3	29.0	47.7	5.2
LDA ²	212 (27.9%)	12.2	20.1	43.1	5.3	6.0	13.3
RDA/AV ³	98 (12.9%)	0.0	6.1	14.2	27.2	40.6	11.9
Uterus ⁴	25 (3.3%)	0.0	1.5	9.8	32.2	52.5	4.0

¹foreign body and related diseases / strano telo i povezane bolesti;

²Left-side displacement of the abomasum / dislokacija sirišta na levo;

³Right-side displacement of the abomasum with or without abomasal volvulus / dislokacija sirišta na desno sa ili bez torzije sirišta;

⁴Rupture and uterine torsion / pucanje i torzija uterus

Discussion / Diskusija

The results in Table 1 show that a foreign body was the commonest disease of the alimentary tract in cows treated at our Clinic.

Peritoneal fluids can be analyzed to aid in diagnosis. The surface of parietal and visceral peritoneum is 1.5 larger than the surface of the skin (Hosgood and Salisbury, 1989; Radostits *et al.*, 2007). Fluid that is normally found in abdominal cavities is characteristically low in protein and contains few cells. It is thought to be an ultra filtrate of plasma, and the mesothelial lining cells may regulate the fluid flow (Hosgood and Salisbury, 1989). Complete fluid analysis includes protein measurement, cell count, and the types of cells present (Hirsch and Townsend, 1982; Hosgood and Salisbury, 1989; Radostits *et al.*, 2000; 2007). According to findings in literature, peritoneal fluid is of lesser diagnostic value in cattle (Radostits *et al.*, 2000, 2007; Rosenberger, 1979). The cause of this is a low amount of fluid, the site and type of inflammatory reaction, an inadequate technique for collection, and an inexperienced clinician. In cows, abdominal disorders are predominantly without distinct signs for a longer period of time. Therefore it is recommended to carry out abdominocentesis repeatedly in accordance with the course of the disease and the clinical picture (Frame and Cert, 1997; House *et al.*, 1992; Samad *et al.*, 1994a; 1994b).

Adominocentesis which is performed to the most ventral part of the abdomen close to the linea alba is usually ineffective, because abdominal fluid is obtained instead of rumen fluid (Kopcha and Schultze, 1991; Zadnik, 2000; Wilson *et al.*, 1985). Wilson *et al.* (1985) report that abdominocentesis within this area in 85 cows with traumatic reticuloperitonitis was successful only in one case. With regard to our extensive experiences and the results of the study by Kopcha and Schultze (1991), we recommend that abominocentesis in cows with hardware and the diagnosis of anterior abdominal pain is performed 5-8 cm caudally from regio xyphoidea, approximately 5 cm to the left or right from the linea alba.

The sample of peritoneal fluid is an indicator of the pathophysiological status of the parietal and the visceral surface of mesotelial layers of the peritoneum. On the basis of analyses of the obtained results, extensive clinical and laboratory experiences, we are of the opinion that the diagnosis of abdominal disorders is incomplete without physical and microscopic analyses of peritoneal fluid. The collection and analysis of peritoneal fluid is simple, as it does not require special knowledge or equipment. It is merely an everyday clinical routine. The technique for collection is quick and therefore not invasive. The sedation of the cow is not necessary because penetration of the cannula is similar to s/c, i/m or i/v application of medicine. Nevertheless, the clinician should be aware that it is a surgical procedure and that septic and antiseptic principles must be observed. We recommend that the indication of the location and reversibility of abdominocentesis are determined by the clinicians themselves with regard to the current clinical status of the animal.

Cranio-ventral location of puncture on the left hand site was mostly performed in cows with symptoms of anterior abdominal pain (hardware). Caudo-ventral location of puncture on the right hand site of the abdominal wall was mostly performed in cows with symptoms of diseases of the abomasum and other abdominal disorders.

Conclusion / Zaključak

On the basis of extensive experiences and the data in our study of 779 clinical cases, abdominocentesis and abdominal fluid analyses proved as an effective tool in everyday buiatric practice. Abdominocentesis and abdominal fluid analyses are quick, simple and reliable. Because abdominocentesis and peritoneal fluid analyses are not only a reliable diagnostic but also a valuable surgical method of treatment of all abdominal diseases in cattle, we highly recommend it.

ACKNOWLEDGEMENT / NAPOMENA:

We appreciate very much the time and effort that has been contributed by all people involved in this project in the laboratory and the field. The project "Epidemiology and preventive abdominal diseases of ruminants in Slovenia" was made possible by the support of the Ministry of Agriculture and Forestry of Slovenia (Project L4-7397-0406-96).

References / Literatura

1. Anderson DE, Cornwell D, Anderson LS, St-Jean G, Desrochers A. Comparative analyses of peritoneal fluid from calves and adult cattle. *Am J Vet Res* 1995; 56(5): 973-6.
2. Frame NW, Cert VA. The use of abdominocentesis in cattle. *Cattle Practice*, BCVA 1997; 5: 35-8.
3. Hanson RR, Nixon AJ, Gronwall R. Evaluation of peritoneal fluid following intestinal resection and anastomosis on horse. *Am J Vet Res* 1992; 53: 216-21.
4. Hirsch VM, Townsend HGG. Peritoneal fluid analysis in the diagnosis of abdominal disorders in cattle. A retrospective study. *Can Vet J* 1982; 23: 348-54.
5. Hosgood GL, Salisbury SK. Pathophysiology and pathogenesis of generalized peritoniti. *Problems in Veterinary Medicine* 1989; 1: 159-67.
6. House JK, Smith BP, Van Metre DC, Flecteau G, Craychee T, Neves J. Ancillary test for assessment of the ruminant digestive system. *Veterinary Clinics of North America. Food Anim Pract* 1992; 8: 203-32.
7. Kopcha M, Schultze AE. Abdominocentesis in cattle and interpretation of non-neoplastic samples. *The Compendium of Continuing Education* 1991; 13: 703-8.
8. Marek J, Mocsy J. *Leherbuch der Klinischen Diagnostik der Inneren Krankheiten der Haustiere*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1956, 192.
9. Oehme FW. Cytology examination of the peritoneal fluid in the diagnosis of cattle diseases. *J Am Med Assoc* 1969; 155: 1923-27.
10. Oehme FW, Moorsdy JL. Examination of peritoneal fluid in differential diagnosis of bovine disease. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 65: 54-9.

11. Radostits OM, Mayhew IG, Houston DM. Veterinary clinical examination and diagnosis. W.B. Saunders, London, 2000; 454.
12. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. Saunders Elsevier, London, 2007; 202.
13. Rosenberger C. Clinical examination of cattle. Veterinary Clinics of North America. Food Anim Pract 1979; 255-7.
14. Samad A, Awaz KB, Sarkate LB. Diagnosis of bovine reticuloperitonitis I. Strength of clinical signs in predicting correct diagnosis. J Appl Anim Res 1994a; 6: 13-8.
15. Samad A, Awaz KB, Sarkate LB. Diagnosis of bovine reticuloperitonitis II. Blood trypsin inhibitor as a diagnostic test. J Appl Anim Res 1994b; 6: 19-25.
16. Zadnik T, Modic T, Jazbec I. Diagnostični pomen laparo-ruminotomije pri govedu. Vet Novice 1992; 18: 299-305.
17. Zadnik T, Jazbec I. Laparorumenotomy - diagnostic significance - a review of 20-year research. In: XIX World Buiatrics Congress: Proceedings, Edinburgh, 8 - 12 July 1996, (Cattle Practice), Edinburgh, BCVA, 1996; 675-7.
18. Zadnik T. Abdominocenteza pri govedu. Vet Novice 2000; 26(3): 61-7.
19. Žemva M, Žemva Mimica. Biokemične preiskave v medicini – s tolmačenjem rezultatov, Ljubljana. Farmaceutski Vestnik 1960; 472.
20. Wilson AD, Hirsch VM, Osborne AD. Abdominocentesis in cattle: Technique and criteria for diagnosis of peritonitis. Ca Vet J 1985; 26: 74-80.

SRPSKI

**RETROSPEKTIVNA STUDIJA PERITONEALNIH TEČNOSTI KOD KRAVA SA
POREMEĆAJIMA ABDOMENA**

T. Zadnik

Na Klinici za preživare u Ljubljani, vršena su ispitivanja peritonealne tečnosti kod krava tokom 30 godina. Ispitano je ukupno 779 krava: 444 krave su imale traumatski retikuloperitonitis, 212 je imalo levu dislokaciju sirišta, 98 krava je imalo desnu dislokaciju sirišta, sa ili bez torzije sirišta, i 25 krava je imalo probleme sa matericom. Abdominocenteza, makroskopska i mikroskopska istraživanja peritonealne tečnosti (fizički izgled, diferencijacija na transudat/eksudat, citološke karakteristike) pružili su dragocenu dijagnostičku informaciju. Na osnovu rezultata 779 laboratorijskih ispitivanja zaključili smo da abdominalna tečnost ima značajnu vrednost kod postavljanja dijagnoze, određivanja terapije i prognoze kod nekoliko akutnih i hroničnih bolesti abdomena.

Ključne reči: abdominocenteza, poremećaji abdomena, krava, peritonealna tečnost

**РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ У КОРОВ
С РАССТРОЙСТВАМИ АБДОМЕНА**

Т. Задник

На Клинике для жвачных животных в Любляне, совершены испытания перитонеальной жидкости у коров в течение 30 лет. Испытано совокупно 779 коров: 444 коровы имели травматический ретикулперитонит, 212 имели левую дислокацию сычуга, 98 коров имели правую дислокацию сычуга с или без торсии сычуга, и 25 коров имели проблемы с маткой. Абдоминоцентез, макроскопические и микроскопические исследования перитонеальной жидкости (физический вид, дифференциация на транссудат) экссудат, цитологические характеристики) подали ценную диагностическую информацию. На основе результатов 779 лабораторных испытаний мы сделали вывод, что абдоминальная жидкость имеет значительную стоимость у поставления диагноза, определения терапии и прогноза у несколько острых и хронических болезней абдомена.

Ключевые слова: абдоминоцентез, расстройства абдомена, корова, перитонеальная жидкость

UTICAJ DAVANJA ENERGETSKOG DODATKA U HRANI NA ZDRAVSTVENO STANJE I PROIZVODNE REZULTATE VISOKOMLEČNIH KRAVA*

EFFECT OF ADMINISTERING ENERGY SUPPLEMENT IN FEED ON BODY CONDITION AND PERFORMANCE OF HIGH-YIELD DAIRY COWS

H. Šamanc, Danijela Kirovski, M. Adamović, I. Vujanac, R. Prodanović,
M. Radivojević, D. Nikić, Camelia Tulcan**

Cilj istraživanja u ovom radu je bio da se utvrdi uticaj energetskog dodatka na bazi glicerola u ishrani visokomlečnih krava na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate u ranoj fazi laktacije. Petnaest dana pre teljenja odabrano je 47 krava koje su podeljene u dve grupe: kontrolnu (n=26) i oglednu (n=21). Kravama ogledne grupe je u poslednje dve nedelje zasušenja i do 60. dana laktacije dodavan u hranu preparat "Energy Top" (Biochem GMBH, Nemačka), u količini od 250 ml dnevno. Svim kravama je ocenjena telesna kondicija (OTK) 10 dana pre teljenja, 15. i 60. dana nakon teljenja. Uzorci krvi su uzeti 10 dana pre i 15 dana nakon teljenja i u njima su određeni koncentracija glukoze i beta hidroksi-buterne kiseline (BHBA). Kod svih krava je izmerena prosečna dnevna proizvodnja mleka 30. i 60. dana laktacije. Rezultati su pokazali da su razlike u OTK između perioda zasušenja i perioda puerperijuma, odnosno perioda zasušenja i 60. dana laktacije u okviru fizioloških vrednosti kod ogledne grupe krava, a veće od fizioloških vrednosti kod kontrolne grupe. Koncentracija glukoze je bila statistički značajno viša kod ogledne nego kod kontrolne grupe krava 10 dana pre teljenja ($p < 0,05$) i 15 dana nakon teljenja ($p < 0,01$). Petnaest dana nakon teljenja koncentracija BHBA kod kontrolne grupe krava je bila značajno veća ($p < 0,01$) nego kod ogledne grupe. 30. i 60. dana laktacije mlečnost

* Rad primljen za štampu 01. 02. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Horea Šamanc, redovni profesor, dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. vet. Milan Adamović, Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina (ITNMS), Beograd; mr sci. med. vet. Ivan Vujanac, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; Radiša Prodanović, dr vet. med., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; Mihajlo Radivojević, Institut PKB, Agroekonomik, Beograd; D. Nikić, Biochem Balkan, Beograd; Camelia Tulcan, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Timisoara, Romania

krava ogledne grupe je bila veća, ali ne statistički značajno, od mlečnosti kontrolne grupe krava. Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu korišćenja energetskeg dodatka kao sastavni deo obroka u peripartalnom periodu u cilju sprečavanja promena u telesnoj kondiciji krava za više od 0,7 poena, kao i da kod krava sa dnevnom proizvodnjom mleka do 30 l energetski dodatak ima stimulativni uticaj na proizvodnju mleka do uspostavljanja energetske ravnoteže, odnosno u ovom slučaju oko tridesetog dana posle teljenja.

Ključne reči: energetski dodatak, visokomlečne krave, zdravstveno stanje, proizvodni rezultati

Uvod / Introduction

U periodu oko teljenja kod visokomlečnih krava nastaju najznačajnije promene u prometu hranljivih materija (Drackley, 1999). Neposredno posle teljenja, sa početkom laktacije, znatno se povećavaju potrebe za energijom koje se većim delom zadovoljavaju energetskeim izvorima iz obroka, a drugim delom mobilizacijom i razlaganjem masti iz telesnih depoa. Očito je da u ovom periodu, a naročito na početku laktacije, regulatorni mehanizmi usmeravaju metaboličke procese tako da u masnom tkivu dominira lipoliza, a u jetri glukoneogeneza i lipogeneza (Bauman i Currie, 1980). Zbog toga, kod visokomlečnih krava postoji stalna opasnost od poremećaja metabolizma koje u prvom redu karakteriše smanjivanje intenziteta glukoneogeneze i intenziviranje procesa ketogeneze. U takvim slučajevima, životinje mogu da prebrode metaboličku krizu stimulacijom glukoneogeneze egzogenim ili endogenim putem. Imajući u vidu da se životinje na početku laktacije nalaze u stanju negativnog bilansa energije, mnogo je povoljnije da se glukoneogeneza stimuliše egzogenim putem, izuzev u slučajevima kada nedostatak ugljenih hidrata treba brzo da se nadoknadi parenteralnim davanjem rastvora glukoze (Šamanc i sar., 1992). Izraziti predstavnici jedinjenja koja mogu da doprinose glukoneogenezi su glicerol, propilen-glikol i natrijum-propionat (Bergman, 1973). Glicerol i propilen-glikol u najvećoj meri ne podležu procesima fermentacije u buragu, pa nakon resorpcije doprinose stvaranju glukoze i očuvanju optimalnih rezervi glikogena u jetri. Za natrijum-propionat je dokazano da ima određene efekte, ali njegov učinak na glikemiju i rezerve glikogena u jetri zaostaje za učinkom glicerola i propilen-glikola. Za glicerol je utvrđeno da se dobro resorbuje i da, osim što deluje kao glukogenoplastično jedinjenje, predstavlja i značajan izvor energije koja je preko potrebna visokomlečnim kravama u ranoj fazi laktacije (Burns, 1963; Fischer i sar., 1973). U poslednje vreme se preparati koji sadrže glicerol ili propilen-glikol sve više preporučuju kao dodaci u ishrani visokomlečnih krava u periodu oko teljenja i u ranoj fazi laktacije dok se ne uspostavi energetska ravnoteža (Sauer i sar., 1973). Opšte je poznato da krave

čija je proizvodnja do 30 litara mleka na dan, postižu energetsku ravnotežu do polovine avansnog perioda. Međutim, krave sa dnevnom proizvodnjom mleka većom od 40 litara, energetsku ravnotežu uspostavljaju tek pri kraju avansnog perioda. Zbog toga je najpravičniji način za ublažavanje posledica negativnog bilansa energije na početku laktacije korišćenje jedinjenja koja predstavljaju glukogenoplastične i energetske prekurzore. Njihova upotreba sprečava nekontrolisanu mobilizaciju masti iz telesnih depoa i nastajanje zamašćenja jetre i ketoznog stanja, koja izaziva zdravstvene probleme, smanjenje proizvodnje mleka i poremećaje u reprodukciji (Fischer i sar., 1973; Sauer i sar., 1973).

Cilj istraživanja u ovom radu je bio da se utvrdi uticaj energetskog dodatka na bazi glicerola ("Energy Top") u ishrani visokomlečnih krava na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate krava u ranoj fazi laktacije.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Na farmi visokomlečnih krava holštajn-frizijske rase odabrano je 47 krava 15 dana pre očekivanog termina teljenja. Krave su držane u vezanom sistemu u stajama zatvorenog tipa. Prosečna proizvodnja mleka odabranih krava u prethodnoj laktaciji je bila 6000 litara. Krave su hranjene obično dva puta dnevno, a osnovna hraniva su bila silaža cele biljke kukuruza i krmna smeša. Sve krave uključene u ogled su hranjene na isti način, kako u peripartalnom periodu, tako i do 60. dana laktacije.

Krave odabrane za ova ispitivanja su petnaest dana pre očekivanog termina teljenja podeljene u dve grupe: kontrolnu (n=26) i oglednu (n=21). Kravama ogledne grupe je u poslednje dve nedelje zasušenja i do 60. dana laktacije dodavan u hranu preparat "Energy Top" (Biochem GMBH, Nemačka) u količini od 250 mililitara dnevno, prskalicom. Kravama uključenim u ogled ocenjena je telesna kondicija u zasušenju (10 dana pre očekivanog termina teljenja), ranom puerperijumu (15. dana nakon teljenja) i 60. dana laktacije. Telesna kondicija krava je ocenjivana prema sistemu Elanco Animal Health Buletin AL 8478. Prema ovom sistemu ocena telesne kondicije krava izražava se numerički od 1 do 5 poena. Svaka promena u telesnoj kondiciji za jedan poen podrazumeva promenu telesne mase najmanje za 55 do 75 kilograma. Smatra se da razlike u vrednostima ocena telesne kondicije između pojedinih faza proizvodno-reproduktivnog ciklusa treba da se kreću od 0,5 do 0,7 poena. Uzorci krvi su uzeti punkcijom vene jugularis 10 dana pre očekivanog termina teljenja (period zasušenja) i 15 dana nakon teljenja (period puerperijuma). Uzorci krvi su uzimani u 10h pre podne, odnosno 4 sata nakon davanja jutarnjeg obroka. U toku uzimanja krvi određivana je koncentracija glukoze i beta hidroksi-buterne kiseline (BHBA) komercijalnim test trakama (Precision Xceed).

Svim kravama je izmerena prosečna dnevna proizvodnja mleka 30. i 60. dana laktacije.

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunati su srednje vrednosti i standardna devijacija. Za ocenu statističkih značajnosti razlika srednjih vrednosti primenjen je Studentov t-test.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Rezultati ocene telesne kondicije krava uključenih u ogled prikazani su u tabeli 1 i 2.

U tabeli 1. prikazane su prosečne vrednosti za ocenu telesne kondicije krava ogledne (krave koje su dobijale "Energy Top") i kontrolne grupe (krave koje nisu dobijale energetski dodatak) tokom perioda zasušenja, puerperijuma i 60. dana laktacije.

Tabela 1. Prosečna ($X \pm SD$) ocene telesne kondicije (OTK) kod ogledne i kontrolne grupe krava /

Table 1. Average ($X \pm SD$) body condition score (BCS) in experimental and control cows

	OTK / BCS		Fiziološke vrednosti / Physiological values
	Ogledna grupa / Experimental group	Kontrolna grupa / Control group	
Zasušenje / Dry period	$3,56 \pm 0,32$	$3,86 \pm 0,29$	3,50 – 4,00
Puerperijum / Puerperium	$2,98 \pm 0,23$	$2,85 \pm 0,46$	2,50 – 3,50
60. dan laktacije / Day 60 of lactation	$2,97 \pm 0,46$	$3,12 \pm 0,32$	2,50 – 3,25

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 zapaža se da ne postoji značajna razlika u oceni telesne kondicije krava između ogledne i kontrolne grupe u sva tri ispitivana perioda

U tabeli 2. prikazane su razlike u prosečnoj oceni telesne kondicije između perioda zasušenja i ranog puerperijuma, zasušenja i 60. dana laktacije kod krava ogledne i kontrolne grupe.

Tabela 2. Razlike u oceni telesne kondicije između ispitivanih perioda kod ogledne i kontrolne grupe krava /

Table 2. Differences in body score between examined periods in experimental and control cows

	Razlika u OTK / Difference in BCS		Fiziološka vrednost / Physiological value
	Ogledna grupa / Experimental group	Kontrolna grupa / Control group	
Zasušenje – Puerperijum / Dry period - Puerperium	$0,58 \pm 0,30$	$1,01 \pm 0,34$	<0,7
Zasušenje – Rana laktacija / Dry period - Early lactation	$0,59 \pm 0,38$	$0,74 \pm 0,13$	

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 2 zapaža se da su razlike u OTK između perioda zasušenja i perioda puerperijuma, odnosno perioda zasušenja i 60. dana laktacije, u okviru fizioloških vrednosti kod krava koje su dobijale "Energy Top" (ogledna grupa), dok je kod kontrolne grupe ova razlika veća od fiziološki dozvoljenih vrednosti; najveća razlika je utvrđena između zasušenja i puerperijuma (1,01 poen).

Ocena telesne kondicije kao metoda kliničkog pregleda je veoma pouzdan pokazatelj energetskog statusa krava. Pri tome je veoma važno naglasiti da ocena telesne kondicije krava treba da se dopuni podacima o razlikama u telesnoj kondiciji između ispitivanih perioda. Tako na primer, ako se uporede dobijene prosečne vrednosti ocene telesne kondicije kontrolne i ogledne grupe krava može se uočiti da su one u granicama fizioloških vrednosti i da se značajno ne razlikuju između ispitivanih grupa krava. Međutim, dobijene razlike pokazuju da kod krava ogledne grupe nije bilo značajnijih oscilacija telesne kondicije između tri ispitivana perioda, što nije bio slučaj kod krava kontrolne grupe, kod kojih je značajna razlika utvrđena između perioda zasušenja i perioda puerperijuma. Po svemu sudeći, korišćenje energetskog dodatka je sprečilo značajno odstupanje u telesnoj kondiciji tretiranih krava pri prelasku iz zasušenja u laktaciju, odnosno nekontrolisanu mobilizaciju masti iz telesnih depoa. Poznata je činjenica da kod visokomlečnih krava u ranoj fazi laktacije zbog negativnog bilansa energije jedan deo nedostajuće energije mora da se nadoknadi iz sopstvenih rezervi. Ako je ovaj proces umeren, promene u telesnoj kondiciji u ovom kritičnom periodu su u skladu sa energetskim potrebama organizma. U ovakvim uslovima ne postoji mogućnost većeg opterećenja jetre niti njenog zamašćenja (Šamanc i sar., 2008).

U tabeli 3 prikazane su prosečne vrednosti koncentracije glukoze kod ogledne i kontrolne grupe krava tokom perioda zasušenja i puerperijuma.

Tabela 3. Koncentracija ($X \pm SD$) glukoze (mmol/l) u krvi krava ogledne i kontrolne grupe /
Table 3. Concentrations ($X \pm SD$) of glucose (mmol/l) in blood of experimental and control cows

		Glukoza / Glucose (mmol/l)	Referentne vrednosti / Reference values
Zasušenje / Dry period	Ogledna / <i>Experimental</i>	3,25 $\pm$ 0,39*	2,64 - 3,8 mmol/l
	Kontrolna / <i>Control</i>	2,81 $\pm$ 0,27	
Puerperijum / Puerperium	Ogledna / <i>Experimental</i>	3,69 $\pm$ 0,54**	2,27 - 2,81 mmol/l
	Kontrolna / <i>Control</i>	3,03 $\pm$ 0,26	

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu za isti vremenski period;

** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu za isti vremenski period /

* $p < 0,05$ against control group for the same time period;

** $p < 0,01$ against control group for the same time period

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 3 zapaža se da je koncentracija glukoze bila statistički značajno viša kod krava koje su dobijale energetski do-

datak u odnosu na kontrolnu grupu, kako u periodu zasušenja ($p < 0,05$), tako i tokom puerperijuma ($p < 0,01$).

U tabeli 4. prikazane su prosečne vrednosti za koncentraciju BHBA kod ogledne i kontrolne grupe krava (krave koje su dobijale "Energy Top").

Tabela 4. Koncentracije ($X \pm SD$) BHBA (mmol/l) kod ogledne i kontrolne grupe krava /
Table 4. Concentrations ($X \pm SD$) of BHBA (mmol/l) in experimental and control cows

		BHBA (mmol/l) / BHBA (mmol/l)	Referentne vrednosti / Reference values
Zasušenje / Dry period	Ogledna / <i>Experimental</i>	$0,37 \pm 0,17$	<0,6 mmol/l
	Kontrolna / <i>Control</i>	$0,41 \pm 0,13$	
Puerperijum / Puerperium	Ogledna / <i>Experimental</i>	$0,59 \pm 0,28^{**}$	<1,0 mmol/l
	Kontrolna / <i>Control</i>	$1,00 \pm 0,19$	

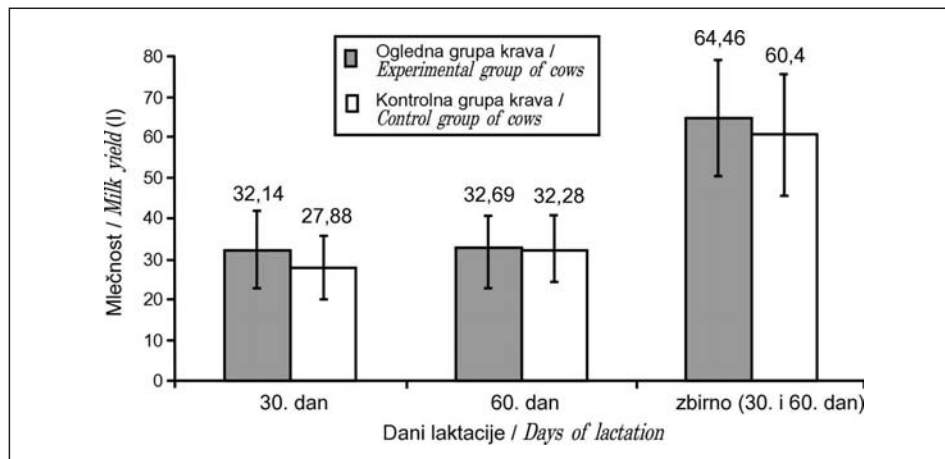
$^{**}p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu za isti vremenski period /

$^{**}p < 0,01$ against control group for the same time period

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4 zapaža se da je koncentracija BHBA kod krava koje su dobijale "Energy Top" bila u okviru fizioloških vrednosti, kako tokom zasušenja tako i posle teljenja, dok je koncentracija BHBA kod kontrolne grupe bila značajno veća ($p < 0,01$).

Kod krava u zasušenju mlečna žlezda crpi neznatne količine glukoze, dok je nakon teljenja ona glavni uzrok glikemije pa i hipoglikemičnog stanja (Stamatović i sar., 1983). Kod krava koje proizvode veće količine mleka, naročito u ranoj fazi laktacije, potrebe mlečne žlezde za glukozom mogu da budu veće nego što je kapacitet glukoneogeneze. Rezultati ispitivanja u ovom radu pokazuju povoljan uticaj primenjenog preparata na stepen glukoneogeneze kod krava ogledne grupe, kod kojih su vrednosti glikemije u zasušenju i ranom puerperijumu značajno veće nego kod krava kontrolne grupe. Međutim, i kod krava kontrolne grupe vrednosti glikemije u graviditetu i posle teljenja su bile u opsegu fizioloških vrednosti. Posebno je interesantan nalaz petnaestog dana posle teljenja kada je prosečna vrednost glikemije bila $3,03 \pm 0,26$ mmol/l, a prosečna koncentracija BHBA je bila veća od fiziološke vrednosti ($1,00 \pm 0,19$ mmol/l). To pokazuje da su kod krava kontrolne grupe u većoj meri korišćene telesne rezerve masti te je zbog toga bila veća mogućnost da se intenzivira proces ketogeneze. U prilog tome najbolje govori razlika u telesnoj kondiciji koja je ustanovljena između zasušenja i ranog puerperijuma (1,01 poen). Stamatović i sar. (1983a) navode da i kada su vrednosti glikemije u fiziološkim granicama ($2,83 - 3,33$ mmol/l) kod 25% tek otehlenih krava u mokraći mogu da se otkriju patološke koncentracije ketonskih tela. Kod tih životinja se u većem stepenu kao izvor energije koriste masti iz telesnih depoa. Zbog pojačanog priliva masnih kiselina u jetru jedan deo proizvoda njihovog katabolizma se usmerava u proces ketogeneze i time povećava opasnost za nastajanje ketoznog stanja.

Na grafikonu 1 prikazana je prosečna mlečnost ogledne i kontrolne grupe krava 30. i 60. dana posle teljenja, kao i prosečna zbirna vrednost mlečnosti dobijena 30. i 60. dana laktacije.



Grafikon 1. Mlečnost krava (l) na farmi /
Graph 1. Milk production of cows (l) on the farm

Mlečnost krava koje su dobijale energetski dodatak "Energy Top" (ogledna grupa) bila je $32,14 \pm 9,49$ litara na prvoj mlečnoj kontroli (30 dana posle teljenja), dok je mlečnost kod krava koje nisu dobijale energetski dodatak (kontrolna grupa,) na istoj kontroli bila $27,88 \pm 7,89$ litara. To znači da su krave koje su dobijale energetski dodatak imale veću mlečnost u odnosu na kontrolnu grupu krava za 4,26 litre, odnosno 15,28 %. Ova razlika je bila blizu granice statističke značajnosti ($p = 0,07$).

Mlečnost krava koje su dobijale energetski dodatak na drugoj kontroli bila je $32,69 \pm 7,76$ litara, dok je mlečnost kod krava koje nisu dobijale energetski dodatak na istoj kontroli bila $32,28 \pm 8,28$ litara. Prema tome, krave koje su dobijale energetski dodatak imale su neznatno veću mlečnost u odnosu na kontrolnu grupu krava (0,41 litar, odnosno 1,27 %).

Mlečnost krava koje su dobijale energetski dodatak bila je $64,46 \pm 14,00$ litara obračunato zbirno za obe kontrole, dok je mlečnost kod krava koje nisu dobijale energetski dodatak bila $60,40 \pm 14,93$ litara. To praktično znači da je ukupna proizvodnja mleka do 60. dana laktacije kod krava koje su dobijale energetski dodatak bila veća u odnosu na kontrolnu grupu krava za 4,32 litre, odnosno 6,72 posto.

Po svemu sudeći, dodavanje glicerola u obrok kravama u zasušenju i na početku laktacije, može uspešno da prevenira poremećaje metabolizma ugljenih hidrata i masti (Fischer i sar., 1973). Veća proizvodnja mleka na prvoj kontroli

za 15,28 %, odnosno zbirno za obe kontrole za 6,72 % kod krava koje su preko hrane dobijale energetski dodatak (Energy Top) može se tumačiti kao rezultat bržeg prilagođavanja na proizvodnju mleka i blagovremenog uspostavljanja energetske ravnoteže. Za visokomlečne krave je poželjno da vrh laktacije dostignu do kraja avansnog perioda. Međutim, zbog poremećaja zdravlja period prilagođavanja može da traje duže, zbog čega životinje u prvoj fazi laktacije ne mogu da ostvare očekivanu proizvodnju mleka. Primena energetskog dodatka je omogućila da krave lakše prebrode period negativnog bilansa energije i primereno svom potencijalu 30. dana posle teljenja postignu visoku proizvodnju, koja je bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu krava.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Promene telesne kondicije krava u peripartalnom periodu mogu da imaju važnu ulogu u procesu metaboličkog prilagođavanja i proizvodnji mleka u ranoj fazi laktacije.
2. Radi sprečavanja promena u telesnoj kondiciji krava za više od 0,7 poena, potrebno je dosledno koristiti energetske dodatke kao sastavni deo obroka u peripartalnom periodu.
3. Kod krava sa dnevnom proizvodnjom mleka do 30 litara energetski dodatak ima stimulativni uticaj na proizvodnju mleka do uspostavljanja energetske ravnoteže, što je u ovom slučaju oko 30. dana posle teljenja.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je delom finansiran sredstvima Ministarstva nauke Republike Srbije TR 20016 pod nazivom: "Razvoj i primena proizvoda na bazi mineralnih sirovina u proizvodnji bezbedne hrane". / *The work was financed in part with funds of the Ministry of Science of the Republic of Serbia TR 20016 entitled: "Development and application of products based on mineral raw materials in production of safe food".*

Literatura / References

1. Bauman DE, Currie W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation, a review of mechanisms involving homeostasis and homeoresis. J Dairy Sci 1980; 63: 1514-29.
2. Bergman E. Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis. Cornell Vet 1973; 63: 341-82.
3. Burns NK. A comparison of the glucogenic effects of some compounds used in the treatment of ketosis. Vet Rec 1963; 75: 763-8.
4. Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? J Dairy Sci 1999; 82: 2259-73.

5. Fischer LJ, Erfle JD, Lodge GA, Sauer FD. Effect of propylen –glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows and feed intake milk yield and composition and incidence of ketosis. *Can J Anim Sci*, 1973; 53: 289-96.
6. Sauer FD, Erfle JD, Fischer LJ. Propylen-glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows and evaluation of blood metabolic parameters. *Can J Anim Sci*, 1973; 53: 265-71.
7. Stamatović S, Šamanc H, Jovanović M. Usporedno ispitivanje koncentracije glikoze u krvi v. auricularis magna i v. subcutanea abdominalis mlečnih krava. *Vet Glasnik* 1983a; 37: 95-9.
8. Stamatović S, Šamanc H, Jovanović M. Prilog izučavanja glikemije i ketonurije u goveda holštajnske rase. *Vet Glasnik*, 1983b; 37: 89-93.
9. Šamanc H, Janković D, Damjanović Z, Marković S, Maksimović A. Primena lekova "Frugliksil" i "Hepafarm" u lečenju ketoze krava. *Vet Glasnik* 1992; 46: 393-9.
10. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I, Prodanović R. Uticaj telesne kondicije krava na učestalost i stepen zamašćenja jetre. *Vet Glasnik* 2008; 62; 3-11.

ENGLISH

EFFECT OF ADMINISTERING ENERGY SUPPLEMENT IN FEED ON BODY CONDITION AND PERFORMANCE OF HIGH-YIELD DAIRY COWS

H. Šamanc, Danijela Kirovski, M. Adamović, I. Vujanac, R. Prodanović,
M. Radivojević, D. Nikić, Camelia Tulcan

The objective of the investigations presented in this work was to establish the effects of a glycerol-based energy supplement in the diet of high-yield dairy cows on their body condition and production results during the early stage of lactation. Forty-seven cows were selected before calving, and they were divided into two groups: controls (n=26) and experimental (n=21). Cows of the experimental group were administered the preparation "Energy Top" (Biochem GMBH, Germany), in a quantity of 250 ml daily during the final two weeks of the dry period and until the 60th day of lactation. The body condition score (BCS) of all cows was determined 10 days before calving, and on days 15 and 60 after calving. Blood samples were taken 10 days before and 15 days after calving, and concentrations of glucose and beta hydroxy-butyric acid (BHBA) were determined in all samples. Average daily milk production of all cows was measured on days 30 and 60 of lactation. The results showed that the differences in BCS between the dry period and puerperium, or the dry period and the 60th day of lactation, were within physiological values in the experimental group of cows, and higher than physiological values in the control group. Glucose concentration was statistically significantly higher in the experimental group than in the control group of cows 10 days before calving ($p<0.05$) and 15 days after calving ($p<0.01$). Fifteen days after calving, the BHBA concentration in the control group of cows was significantly higher ($p<0.01$) than in the experimental group. On days 30 and 60 of lactation, the milk yield of experimental cows was higher than of those in the control group, but the difference was not statistically significant. The obtained results indicate that energy supplements should be used as an integral part of the feed ration during the peripartal period in order to prevent changes in the body condition score of cows by more than 0.7 points, and also that, in cows with a daily milk production of up to 30 l, an energy supplement has a stimulatory ef-

fect on milk production until the establishing of an energy balance, in this case, until around the 30th day following calving.

Key words: energy supplement, high-yield dairy cows, body condition, performance

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ДАВНИЯ ЭНЕРГИТЕЧЕСКОЙ ДОБАВКИ В КОРМЕ НА СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫСОКО-МОЛОЧНЫХ КОРОВ

Х. Шаманц, Даниела Кировски, М. Адамович, И. Вуянац, Р. Проданович, М. Радивоевич, Д. Никич, Камелия Тулкан

Цель этого исследования в этой работе была утвердить влияние энергетической добавки на базе глицерола в кормлении высоко-молочных коров на состояние здоровья и производственные результаты в ранней фазе лактации. Пятнадцать дней до теления отобрано 47 коров, разделенные в две группы: контрольную (n=26) и опытную (n=21). Коровам опытной группы в последние две недели засухения и до 60 дней лактации добавляван в корм препарат "Energy Top" (Biochem ГМБН, Германия), в количестве от 250 мл в день. Всем коровам оценена кондиция тела (ОКТ) 10 дней до теления, 15 и 60 дней после отёла. Образчики крови взяты 10 дней до и 15 дней после отёла и в них определены концентрация глюкозы и бета гидроксид-буферной кислоты (БГБК). У всех коров измерено среднее дневное производство молока 30 и 60 дней лактации. Результаты показали, что разницы в ОКТ между периодом засухения и периодом пуерперия, то есть периода засухения и 60 дней лактации в рамках физиологических стоимостей у опытной группы коров, а больше физиологических стоимостей у контрольной группы. Концентрация глюкозы была статистически значительно более высокая у опытной, чем контрольной группы коров 10 дней до отёла ($p>0,05$) и 15 дней после отёла ($p<0,01$). Пятнадцать дней после отёла концентрация БГБК у контрольной группы коров была значительно более большая ($p<0,01$), чем у опытной группы. Тридцатого и шестидесятого дня лактации молочность коров опытной группы была более большая, но не статистически значительно молочности контрольной группы коров. Полученные результаты указывают на нужду пользования энергетических добавок как составная часть пайка в перипартальном периоде с целью предупреждения изменений в кондиции тела коров для больше 0,7 очков, словно и что у коров с дневным производством молока до 30 л энергетической добавки имеет стимулятивное влияние на производство молока до установления энергетического равновесия, то есть в этом случае дня тридцатого после отёла.

Ключевые слова: энергетическая добавка, высоко-молочные коровы, состояние здоровья, производственные результаты

**UTICAJ BILJNIH EKSTRAKATA DODATIH U HRANU NA
PROIZVODNE I REPRODUKTIVNE REZULTATE PREŽIVARA******POSSIBILITIES FOR USING PLANT EXTRACTS ADDED TO
RUMINANT FEED AIMED AT IMPROVING PRODUCTION RESULTS*****Svetlana Grdović, D. Šefer, B. Petrujkic****

Upotreba biljnih ekstrakata u cilju poboljšanja proizvodnih rezultata i kvaliteta namirnica animalnog porekla je oblast sa sve većom naučnom značajnošću. Mnoga ispitivanja sprovedena na preživarima, ali i drugim vrstama domaćih životinja, imala su za cilj da se ispituju specifične bioaktivne materije biljaka. Rezultati tih istraživanja pokazuju pozitivan uticaj na proizvodne rezultate. Veliki broj podataka ukazuje na to da biljni ekstrakti dodati hrani za životinje doprinose povećanju ukupne produktivnosti. Takođe, biljni ekstrakti kao aditivi u hrani za životinje imaju pozitivan uticaj i na zdravstveno stanje životinja. Veliki broj biljaka poseduje karakteristike koje mogu poboljšati konzumaciju, svarljivost i konverziju hrane i prirast. Ispitivan je uticaj ekstrakata različitih vrsta biljaka na konzumaciju hrane, rast vune, prirast i sastav trupa, proizvodnju mleka, reproduktivne parametre, agense za strižu vune, sprečavanje naduna, proizvodnju metana kao i uticaj biljaka na smanjenje infestacije preživara nematodama. Ovaj rad predstavlja pregled naučnih ispitivanja različitih biljnih vrsta i njihovog uticaja na proizvodne karakteristike preživara.

Ključne reči: biljni ekstrakti, aditivi, preživari, proizvodnja

Uvod / Introduction

Biljke sintetišu i luče različita jedinjenja, pa se u poslednje vreme intenzivno ispituje uticaj njihovih aktivnih principa. Hemijski sastav biljaka je veoma složen i još uvek nedovoljno istražen, a s obzirom na to da je na Zemlji regis-

* Rad primljen za štampu 05. 03. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Svetlana Grdović, docent, dr sci. med. vet. Dragan Šefer, vanredni profesor, mr sci. med. vet. Branko Petrujkic, saradnik u nastavi, Katedra za ishranu i botaniku, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

trovano preko 250.000 vrsta biljaka, mogućnosti za istraživanje i eksperimentalni rad su izuzetno velike.

Prema važećem Pravilniku o metodama organske stočarske proizvodnje (2002), uzgoj domaćih životinja se zasniva na maksimalnom korišćenju ispaše, a u skladu sa dostupnim pašnjačkim površinama u različitim periodima godine. Najmanje 60% suve materije obroka treba da potiče iz krmnog bilja, sveže ili suve kabaste hrane ili silaže. Ostale biljke, njihovi proizvodi i nusproizvodi, koji prema Pravilniku o metodama organske stočarske proizvodnje (2002) mogu da se koriste u ishrani domaćih životinja su: melasa kao vezivno sredstvo u smešama, ekstrakti biljaka, proteinski ekstrakti biljaka (daju se samo mladim životinjama), začini i lekovite biljke.

Pod pojmom BILJNOG EKSTRAKTA (lat. *extrahere* – izvući, izvaditi) podrazumevaju se koncentrovani sastojci koji se dobijaju iz biljnih sirovina. Kao sredstvo za ekstrakciju najčešće se koriste: 1. alkoholi različitih koncentracija koji rastvaraju alkaloidne, heterozidne, tanine, etarska ulja, smole, šećere, organske kiseline, karotenoide; 2. manje polarni rastvarači (acetone, heksan, etar) koji rastvaraju alkaloidne, lipide, smole, voskove; 3. više polarni rastvarači (propilen glikol, glicerol) koji rastvaraju alkaloidne, etarska ulja, biljne pigmente, tanine, gume, smole, skrob; 4. ulja koja rastvaraju lipidne supstance.

Veliki procenat stočarske proizvodnje zasniva se na korišćenju različitih farmaceutskih preparata kao što su antibiotici, kokcidostatski i drugi lekovi. Njihovo korišćenje izaziva sve veću zabrinutost zbog povećanja rezistencije bakterija na lekove (Ruddock, 2000), što predstavlja opasnost po zdravlje ljudi (Barton, 2000). Zabrana upotrebe antibiotika u hrani za životinje od 2006. godine u Evropskoj uniji dovela je do porasta interesovanja za biljne ekstrakte. Jedan od takvih programa je i istraživanje 500 vrsta biljaka i njihovog nematodnog, antibakterijskog i imunostimulativnog dejstva (EU-Replace, 2006). Dokazano je antibiotsko dejstvo velikog broja biljnih metabolita (pretragom literature nailazi se na preko 5000 referenci). Korišćenje biljaka i njihovih bioaktivnih principa zahteva i uzgoj biljaka na poljima, dodavanje u seno ili u vodu.

Uticaj biljnih ekstrakata na preživare /

Effect of plant extracts on ruminants

Unos hrane/ Food intake – Za preživare su biljke veoma bitne jer njihova upotreba prevazilazi okvire samog zadovoljenja potreba u hranljivim materijama. Kondenzovani tanini (CT) predstavljaju veoma raznorodnu grupu jedinjenja i imaju dokazana antinutritivna svojstva. CT poreklom iz *Leucaena leucocephala* imaju manje, dok CT poreklom iz *L. pallida* imaju više izražen negativan efekat na varenje i aktivnost digestivnih enzima. Antinutritivni efekat kondenzovanih tanina zavisi od toga da li su oni vezani za ćelijski zid ili se nalaze rastvoreni u biljkama. Biljke koje sadrže kondenzovane tanine bile su značajan predmet ispitivanja. Mueller-Harvey (2006) je utvrdio da CT imaju pozitivan efekat na proizvodne karakteristike i na unos hrane. Kondenzovani tanini koji su prisutni kod velikog

broja biljaka mogu inhibirati aktivnost mikroorganizama buraga preživara. Dobro su ispitane dve biljne vrste, koje su bogate kondenzovanim taninima. To su dve vrste zvezdana *Lotus corniculatus* (slika 1) i *Lotus pedunculatus* (slika 2). Barry (1985) je dokazao da količina tanina u biljkama zavisi od plodnosti tla. Rezultati istraživanja ukazuju na to da se kod ovaca gajenih na ispaši, na plodnom zemljištu, gde *Lotus corniculatus* sadrži 20-40 g/kg suve materije CT i *Lotus pedunculatus* oko 20g/kg, postiže bolji prirast.



Slika 1. *Lotus corniculatus* L.
Figure 1. *Lotus corniculatus* L.



Slika 2. *Lotus pedunculatus* Cav.
Figure 2. *Lotus pedunculatus* Cav.



Slika 3. *Onobrychis viciaefolia* Scop.
Figure 3. *Onobrychis viciaefolia* Scop.

Rast vune / Wool growth – Rast vune zavisi od resorpcije proteina. Prisutnost CT u zvezdanu i esparzeti (*Onobrychis viciaefolia* – slika 3) u ishrani ovaca, može doprineti povećanju resorpcije aminokiselina. U ogledu koji je trajao 55 dana na Novom Zelandu, ovce napasane zvezdanom su imale bolje reproduktivne performanse i veću proizvodnju vune (Min i sar., 1999). Analizom krvi utvrđeno je da je ovaj efekat nastao usled povećanja unosa esencijalnih aminokiselina i veće energije zvezdana u odnosu na energiju drugih pašnih biljaka.

Prirast životinja i sastav trupa/ Animal growth and trunk composition – Brojna istraživanja uticaja hrane na prirast životinja i hemijski sastav trupa su obuhvatala sadržaj glavnih sastojaka hrane (proteini, masti, ugljeni hidrati), ali se pored toga ne sme zaboraviti činjenica da biljna hraniva sadrže i neke bioaktivne supstance kao što su be-

tain i konjugovana linoleinska kiselina (CLA) koji mogu poboljšati odnos mast-meso u trupu (Sillence, 2004).

Betain je prirodni aminokiselinski derivat (tri metil glicin) nađen u mnogim biljkama (cvekla, repa, beli slez, licium). Ima osmoregulatornu aktivnost i može biti donor metil grupe. Betain poboljšava prirast, smanjujući potrebu u energiji za održavanje života (Schrama i sar., 2003; Suster i sar., 2004). Objašnjenje leži u činjenici da je time smanjena aktivnost Na-K pumpe za održavanje osmolariteta ćelije, a pošto Na-K pumpa za svoj rad troši ATP time se i štedi metionin i energija. Pored toga, betain povećava stepen deponovanja proteina u trupu (Fernandez-Figares i sar., 2002) i smanjuje debljinu leđne masti (Cadogan i sar., 1993). Betain može povećati sposobnost vezivanja vode i smanjiti gubitak vode iz mesa (Eng. *Drip loss*) (Dunshea i sar., 2005). Postoje dokazi da i betain može smanjiti negativni uticaj toplotnog stresa, povećati unos hrane i prirast tovnih goveda. Betain poboljšava integritet ćelija sluznice creva i smanjuje opasnost od nastajanja infekcije. Kod živine (Matthews i Southern, 2000; Klasing i sar., 2002) je utvrđeno da betain, dodat u hranu kao ekstrakt ili poreklom iz biljaka bogatih betainom, može imati veliki broj pozitivnih efekata.

Zasićene masne kiseline poreklom iz crvenog mesa povećavaju rizik za pojavu oboljenja srca i raka debelog creva kod ljudi. Preporuke dijetetičara su da se smanji unos crvenog mesa (Eynard i Lopez, 2003). Esencijalne masne

kiseline kao što je konjugovana linoleinska kiselina mogu imati antikancerogeno, antitrombogeno i antiaterogeno dejstvo.

Polinezasićene masne kiseline (PMK) ispoljavaju antioksidativni efekat, tj. imaju pozitivan uticaj na boju i produžavaju mogućnost očuvanja mesa. Antioksidansi, vitamin E (α -tokoferol), flavoni (kao što je kvercetin) i veliki polifenoli (tanini) imaju brojne biološke efekte, ali pre svega zaštita od slobodnih radikala. Biljke bogate PMK su badem, orah, lešnik, klice žitarica. Visok unos hraniva bogatih vitaminom E dovodi se u vezu sa manjim brojem zaostalih posteljica kod krava, kao i pojavom manjeg broja mastitisa, uz to i meso tih životinja odlikuje se sposobnošću dužeg očuvanja (Demeyer i sar., 2004).

Iako se dosta zna o ulogama PMK, veoma malo se zna o njihovoj metaboličkoj sudbini kod životinja koje se hrane na paši. Zelena masa sa pašnjaka sadrži relativno veliku lepezu različitih masnih kiselina. Životinje hranjene na paši imaju veće količine PMK i CLA u poređenju sa životinjama hranjenim pretežno koncentrovanim hranivima (Realini i sar., 2004). Upotreba biljaka bogatih PMK i CLA kod svinja pruža veliki niz mogućnosti proizvodnje dizajniranih proizvoda i moduliranje hematoloških i humoralnih odgovora u zavisnosti od doze CLA (Ostrowska i sar., 2004). Takođe, pretpostavlja se da povećana proizvodnja CLA u buragu može predstavljati način da se poboljša zdravlje životinja.

Mleko / Milk – Mleko krava i ovaca je kritični faktor za preživljavanje i rast mladih. Kondenzovani tanini u travnim smešama sa zvezdanom povećavaju mlečnost kod ovaca u toku proleća i leta. Zvezdan koji je sadržao 44,5 g/kg suve materije CT ispoljio je pozitivan efekat na mlečnost ovaca. Ustanovljeno je i da kofein povećava razvoj mlečnih žlezda, prinos mleka i prirast telesne mase kod ženki miševa i svinja, ali nema podataka o preživarima (Sheffield, 1991; Li i Hacker, 1995).

Uticaj na reproduktivne parametre / Effect on reproduction parameters – Ispaša ovaca, na pašnjacima koji su sadržali veće količine CT (zvezdan), imala je pozitivniji uticaj na reproduktivne parametre kod ovaca u poređenju sa životinjama koje su gajene na pašnjacima gde nema ovih biljaka. Ramirez-Restrepo i sar. (2005) su utvrdili da je napasanje ovaca na pašnjacima obraslim zvezdanom do 42 dana pre parenja rezultiralo većim brojem bližnjenja ovaca u poređenju sa ovcama koje su hranjene na konvencionalnim pašnjacima.

Agensi za strižu vune ovaca / Agents for sheep wool shearing – Brojne hemikalije su izučavane kao potencijalni agensi za strižu kod merino ovaca još krajem 70-ih godina prošlog veka (Reis, 1978). Mimosin – bioaktivna komponenta biljke *Leucaena leucocephala* (slika 4), pokazao se kao vrlo efikasan u zaustavljanju rasta vune što omogućava da se vuna ručno ukloni. Međutim, ova komponenta je u visokoj koncentraciji toksična. *Leucaena leucocephala* je bila predmet većeg broja istraživanja, pošto je ona brzo rastuće drvo iz familije leguminoza i predstavlja značajan izvor hrane za ljude i životinje u Indiji. Po hranljivoj vrednosti slična je lucerki. Tačno doziranje unosa ove materije hranom, ako potiče

iz sveže biljke (u kojoj koncentracija varira) dovodi njenu aplikaciju u pitanje. Za strižu se pokazalo efikasnijim aplikovanje ekstrakta mimozina u određenoj dozi i u određeno vreme putem drenča ili umešanog u koncentrovane smeše za ishranu ovaca.



Slika 4. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Figure 4. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Nadun – Nadun buraga je često oboljenje goveda na pašnjacima. Penasti nadun nastaje zbog nemogućnosti izbacivanja gasova (koji se normalno stvaraju u buragu). Proantocijanidini, takođe antinutritivne materije, poznate su u sprečavanju naduna goveda još od 1711. godine. Ovo je potvrđeno i u ispitivanju koje su sprovedi (Waghorn i Jones, 1989). Pored opisanog, uočene su i bolje proizvodne karakteristike kod ovaca i goveda napasanih na pašnjacima gde je procenat *Lotus corniculatus* bio veći nego procenat lucerke (Wang i sar., 1996). Poboljšanje proizvodnih rezultata može se pripisati smanjenom gubitku proteina iz buraga i povećanju ukupne resorpcije amino kiselina iako je svarljivost proteina u crevima smanjena.

Proantocijanidini su supstance za koje je dokazano da smanjuju stvaranje pene *in vitro* i njihov efekat je doznno zavisin. Waghorn i Jones (1989) su dokazali da ne dolazi do naduna goveda hranjenih sa *Rumex obtusifolius* (slika 5) (konjštak) u količini od 10% suve materije obroka pri napasanju lucerkom. Takođe je zapaženo da je pojava naduna kod junica ređa ukoliko je u obrok dodata esparzeta u količini od 10–20% suve materije (McMahon i sar., 1999). Moguće je proizvesti seno koje sprečava pojavu naduna, mešanjem lucerke sa biljkama koje sa-

drže CT (esparzeta, zvezdan, konjštak), ali je neophodno za to tačno odrediti procentualno učešće pojedinih biljaka.

Proizvodnja metana / *Methane production*

– Metan nastaje kao sporedni proizvod procesa varenja hrane i predstavlja gubitak energije hrane u vidu gasova (2–12%). Metan je jedan od najvažnijih gasova koji zagađuju čovekovu sredinu i stočarska proizvodnja predstavlja glavni antropogeni izvor metana (Wood i Knipmeyer, 1998). Upotrebi CT i saponina u mogućnosti smanjenja proizvodnje metana posvećeno je dosta pažnje. Leguminoze koje sadrže CT smanjuju stvaranje metana i mikrobnu dezaminaciju zbog interakcije biljka–protein. Smanjenje emisije metana i zaštita proteina od degradacije u buragu može rezultirati smanjenim gubitkom metaboličke energije i smanjenom emisijom azota u vidu gasa. Tanini mogu smanjiti razlaganje proteina u buragu i povećati transfer proteina u duodenum kada se koriste u umerenim dozama (Carulla i sar., 2005). Ipak, ukoliko se ove materije koriste u previsokim dozama, one mogu imati negativan efekat na proizvodne karakteristike životinja. Carulla i sar. (2005) su dodavanjem tanina iz *Acacia mearnsii* u količini od 0,025% suve materije obroka uspjeli da značajno smanje emisiju metana (za 13%). Istraživanje u ovoj oblasti pruža interesantne mogućnosti zamene pojedinih hraniva drugim hranivima koja inkorporišu nutritivne komplekse tanina kao i mehanizam kojim mogu da se obezbede visokokvalitetne vrste hrane i smanji proizvodnja metana.

Saponini (terpenski glikozidi) imaju brojne, i pozitivne i negativne, biološke efekte. Hess i sar. (2003) su utvrdili da plod biljke *Sapindu saponaria* smanjuje proizvodnju metana u *in vitro* kulturi za 11%, kako u čisto travnim smešama tako i u smešama koje sadrže i leguminoze. Za ekstrakt juke (*Yucca schidigera*) postoje dokazi (Pen i sar., 2006) da smanjuje proizvodnju metana. Utvrđeno je da ekstrakt juke stimulise rast *Prevotella ruminicola* i koči rast *Streptococcus bovis*. Antimikrobni efekat je najizraženiji protiv gram-pozitivnih bakterija, što je slično dejstvu jonoformnih antibiotika. S obzirom na te činjenice, upotreba ekstrakta juke može pozitivno uticati na smanjenje proizvodnje ukupne količine kiselina u buragu, a time i na prevenciju acidoze buraga visokomlečnih krava. Pored toga, modulacija bakterijske flore buraga životinja u tovu je vrlo slična modulaciji koja nastaje dodavanjem antibiotika u cilju stimulisanja rasta.



Slika 5. *Rumex obtusifolius* L.
Figure 5. *Rumex obtusifolius* L.

Nematode / *Nematode* – Nematode su velika grupa organizama koja broji preko 30.000 vrsta. Rezistencija gastrointestinalnih nematoda na dejstvo anti-helmintika je značajan problem iako je moderni pristup u održavanju pašnjaka (rotaciono napasanje, drljanje, razmeštanje stajnjaka) od značajne pomoći u kontroli parazita (Nguyena i sar., 2005). Utvrđeno je da napasanje životinja na travnjacima zasejanim zvezdanom i vodopijom (*Chicorium intybus* – slika 6) može smanjiti infestaciju preživara nematodama. Međutim, postavlja se pitanje da li je ovaj efekat posledica same strukture biljke ili nastaje usled aktivnosti polifenolnih biljnih hemikalija iz kabastih hraniva (Marley i sar., 2005).



Slika 6. *Chicorium intybus* L.
Figure 6. *Chicorium intybus* L.

Zaključak / Conclusion

Upotreba ekstrakata biljaka u cilju zaštite zdravlja i poboljšanja proizvodnih karakteristika životinja je oblast sve većeg interesovanja. Mnogobrojne do danas sprovedene studije imale su za cilj da ispituju uticaj specifičnih klasa bioaktivnih molekula kao što su tanini i saponini. Fokus je uglavnom bio na modifikaciji mikroflore buraga, poboljšanju prirasta i smanjenju emisije metana. Poboljšanje kvaliteta mleka i mesa, naročito u smislu postizanja optimalnog masnokiselinskog sastava – oblast je aktivnog istraživanja. Ishrana određenim biljkama ili dodavanje ekstrakata istih pruža mogućnost modifikovanja masnokiselinskog sastava animalnih proizvoda, pa se na taj način može proizvesti zdravija hrana za ljudsku upotrebu. Korišćenje biljnih ekstrakata u cilju eliminacije infestacija nematodama je do danas uglavnom bazirano na upotrebi polifenola. Međutim, poznato je da

pored njih u biljkama postoje i brojna druga jedinjenja sa antinematodnim i antibakterijskim delovanjem. Biljni ekstrakti mogu imati veliki broj pozitivnih efekata na zdravlje i proizvodne osobine životinja, ali treba imati na umu da je neophodno poznavati njihovu tačnu koncentraciju da bi se postigao optimalan efekat jer dodati u količini većoj od potrebne mogu ispoljiti štetna dejstva.

Literatura / References

1. Barry TN. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pendunculatus* for sheep. 3. Rates of body and wool growth. *Br J Nutr* 1985; 54: 211-7.
2. Barton MD. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev* 2000; 13: 279-99.
3. Cadogan DJ, Campbell RG, Harrison D, Edwards AC. The effects of betaine on the growth performance and carcass characteristics of female pigs. In: Batterham, E.S. (Ed.), In: *Manipulating Pig Production*, vol. IV. Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia, 219, 1993.
4. Carulla JE, Kreuzer M, Machmuller A, Hess HD. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust J Agric Res* 2005; 56: 961-70.
5. Demeyer D, Raes K, Fievez V, De Smet S. Radicals and antioxidants in relation to human and animal health: a case for functional feeding. *Commun Appl Biol Sci Ghent University* 2004; 69: 75-91.
6. Dunshea FR, D'Souza DN, Pethick DW, Harper GS, Warner RD. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Sci* 2005; 71: 8-38.
7. EU-replace. <http://www.replace-eu.com/> (accessed 20.08.06), 2006.
8. Eynard AR, Lopez CB. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids Health Dis* 2003; 2: 1-6.
9. Fernandez-Figares I, Wray-Cahen D, Steele NC, Campbell RG, Hall DD, Virtanen E. Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed restricted pig. *J Anim Sci* 2002; 80: 421-8.
10. Hess HD, Monslave LM, Lascano CE, Carulla JE, Diaz TE, Kreuzer M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindu saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Aust J Agric Res* 2003; 54: 703-13.
11. Klasing KC, Adler KL, Remus JC, Calvert CC. Dietary betaine increases intraepithelial lymphocytes in the duodenum of coccidia-infected chicks and increases functional properties of phagocytes. *J Nutr* Aug 2002; 132(8): 2274-82.
12. Li S, Hacker RR. The effect of caffeine on mammary gland development and milk yield in primiparous sows. *J Anim Sci* 1995; 73: 534-40.
13. Marley CL, Fraser MD, Fychan R, Theobald VJ, Jones R. Effect of forage legumes and anthelmintic treatment on the performance, nutritional status and nematode parasites of grazing lambs. *Vet Parasitol* 2005; 131: 267-82.
14. Matthews JO, Southern LL. The effect of dietary betaine in *Eimeria acervulina* - infected chicks. *Poult Sci* 2000; 79: 60-5.

15. McMahon LR, Majak W, McAllister TA, Hall JW, Jones GA, Popp JD, Cheng KJ. Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Can J Anim Sci* 1999; 79: 203-12.
16. Min BR, McNabb WC, Barry TN, Kemp PD, Waghorn GC, McDonald MF. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. *J Agric Sci* 1999; 132: 323-34.
17. Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2006; 86(13): 2010-37.
18. Nguyena TM, Binh DV, Orskov ER. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 121: 77-87.
19. Ostrowska E, Knowles A, Cross RF, Muralitharan M, Bauman DE, Dunshea FR. The effect of conjugated linoleic acid on immunological status in the grower pig. *Aust J Agric Res* 2004; 55: 711-8.
20. Pen B, Sar C, Mwenya B, Kuwaki K, Morikawa R, Takahashi J. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 129: 175-86.
21. Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje. Službeni list Savezne Republike Jugoslavije. Broj 51 od 13. septembra 2002.
22. Ramirez-Restrepo CA, Barry TN, Lopez-Villalobos N, Kemp N, Harvey TG. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 121: 23-43.
23. Realini CE, Duckett SK, Brito GW, Dalla Rizza M, De Mattos D. Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Sci* 2004; 66: 567-77.
24. Reis PJ, Tunks DA, Downes AM. Mimosine, administered orally and two related compounds as chemical defleecing agents for sheep. *Aust J Agric Res* 1978; 29: 1065-75.
25. Ruddock JC. Secondary metabolites as a vital source of animal health products. Special Publication - Royal Soc Chem 2000; 257: 45-58 (Biodiversity: New leads for the pharmaceutical and agrochemical industries).
26. Schrama JW, Heetkamp MJ, Simmins PH, Gerrits WJ. Dietary betaine supplementation affects energy metabolism of pigs. *J Anim Sci* 2003; 81: 1202-9.
27. Sheffield LG. Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. *J Anim Sci* 1991; 69: 1128-32.
28. Sillence MN. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. *Vet J* 2004; 167: 242-57.
29. Suster D, Leury BJ, King RH, Mottram M, Dunshea FR. Interrelationships between porcine somatotropin (pST), betaine, and energy level on body composition and tissue distribution of finisher boars. *Aust J Agric Res* 2004; 55: 983-90.
30. Waghorn GC, Jones WT. Bloat in cattle 46. Potential of dock (*Rumex obtusifolius*) as an antibloat agent for cattle. *NZ J Agric Res* 1989; 32: 227-35.
31. Wang Y, Douglas GB, Waghorn GC, Barry TN, Foote AG, Purchas RW. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance of ewes. *J Agric Sci (Cambridge)* 1996; 126: 87-98.
32. Wood C, Knipmeyer CK. Applied Environmental Science: global climate change and environmental stewardship by ruminant livestock producers. National council for Agricultural Education, 1998; 14.

ENGLISH

**POSSIBILITIES FOR USING PLANT EXTRACTS ADDED TO RUMINANT FEED
AIMED AT IMPROVING PRODUCTION RESULTS**

Svetlana Grdović, D. Šefer, B. Petrujkić

The use of plant extracts with the objective of improving production results and the quality of food articles of animal origin is an area which is acquiring increasing scientific importance. Numerous investigations carried out so far on ruminants and other species of domestic animals have been aimed at examining specific bioactive matter of plants. The results of these investigations have demonstrated a positive influence on the production results. A large number of data indicate that plant extracts added to animal feed contribute to increasing overall productivity. Furthermore, plant extracts as additives in animal feed have a positive effect also on the health condition of the animals. A large number of plants have characteristics which potentially improve consumption, digestibility and conversion of food, and also growth. Examinations have been performed of the effects of different plant extracts on food consumption, wool growth, growth and composition of the trunk, milk production, reproductive parameters, agents for wool shearing, preventing bloat, methane production, as well as the influence of plants on curbing nematode infestations of ruminants. This work presents a review of scientific investigations of different plant species and their effects on the production characteristics of ruminants.

Key words: plant extracts, additives, ruminants, production

РУССКИЙ

**ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ДОБАВЛЕННЫХ В КОРМ НА
ПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЖВАЧНЫХ
ЖИВОТНЫХ**

Светлана Грдович, Д. Шефер, Б. Петруйкич

Употребление растительных экстрактов с целью улучшения производительных результатов и качества пищевых продуктов животного происхождения область с всё более большой научной значительностью. Многие испытания проведены до сегодня на жвачных животных, и других видах домашних животных, имели для цели испытать специфические биоактивные вещества растений. Результаты этих исследований показывают положительное влияние на производительные результаты. Большое число данных указывает на это, что растительные экстракты добавлены корму для животных содействуют увеличению совокупной производительности. Также, растительные экстракты как аддитивы в корме для животных имеют положительное влияние и на состояние здоровья животных. Большое число растений обладают характеристиками, которые потенциально улучшают потребление, переваримость и конверсию корма и прирост. Испытывано влияние экстрактов различных видов растений на потребление корма, рост шерсти, прирост и состав туловища, производство молока, репродуктивные параметры, агенты для стрижки шерсти, предупреждение вздутия, производство метана, слов-

но и влияние растений на уменьшение заражения жвачных животных нематодами. Эта работа представляет собой обзор научных испытаний различных растительных видов и их влияния на производительные характеристики жвачных животных.

Ключевые слова: растительные экстракты, аддитивы, жвачные животные, производство

**UTICAJ EKSTRAKTA PODZEMNIH ORGANA *HELLEBORUS*
ODORUS W. ET K. NA CRVENU KRVNU SLIKU
WISTAR PACOVA***

***INFLUENCE OF HELLEBORUS ODORUS W. ET K. UNDERGROUND
PARTS EXTRACTS ON RED BLOOD PICTURES OF WISTAR RATS***

**Vesna Davidović, M. Lazarević, Mirjana Joksimović-Todorović,
Z. Maksimović, M. Jovanović, N. Miljas****

U ovom radu su prikazani rezultati ispitivanja vrednosti parametara crvene krvne slike pacova soja Wistar, nakon intramuskularne aplikacije ekstrakta rizoma i korena Helleborus odorus W. et K. Ogled je izveden u eksperimentalnim uslovima na 49 pacova soja Wistar, podeljenih u 7 grupa sa po 7 jedinki (jedna kontrolna i šest oglednih grupa). Kontrolnoj grupi pacova je intramuskularno aplikovan fiziološki rastvor (0,25 ml/100 g t.m.). U cilju određivanja dužine trajanja efekata ekstrakta, pacovima je aplikovan tečni ekstrakt podzemnih organa kukureka u koncentraciji od 10 mg/100 g t.m., a krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom nakon 24h, 48h i 72h. Ispitivan je i uticaj ekstrakta izlaganog povišenoj temperaturi na uočene efekte, 24h posle aplikacije inaktivisanog (56°C 30 min) ili denaturisanog ekstrakta (100°C 5 min), kao i efekat dijalizata ekstrakta. Dobijeni rezultati hematoloških analiza su ukazali na slabu hemolitičku aktivnost ekstrakta. Kod svih oglednih grupa, prosečan broj eritrocita bio je smanjen, ali se održao u granicama referentnih vrednosti. Zabeležene koncentracije hemoglobina i hematokrita u krvi pacova kontrolne i oglednih grupa bile su niže u odnosu na fiziološke vrednosti, pri čemu korišćeni ekstrakt nije značajno uticao na ispitivane parametre.

Ključne reči: kukurek, crvena krvna loza, pacovi

* Rad primljen za štampu 29. 04. 2010. godine

** Mr sci. med. vet. Vesna Davidović, asistent, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Mirjana Joksimović-Todorović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Univerzitet u Beogradu; dr sc. pharm. Zoran Maksimović, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Milan Jovanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; mr sci. med. vet. Niko Miljas, Veterinarska stanica Trebinje, R. Srpska, BiH

Uvod / Introduction

Etnoveterinarska ili narodna veterinarska medicina obuhvata integrisanje i primenu različitih lokalnih saznanja, veština i postupaka u cilju nege, očuvanja zdravlja i dobrobiti radnih i proizvodnih životinja (Köhler-Rollefson i Bräunig, 1998). Fitoterapija, kao vid tradicionalne medicine, podrazumeva sprečavanje nastanka i lečenje blažih oblika bolesti ljudi i životinja prirodnim lekovitim sirovinama i biljnim pripravcima. Viševjekovna upotreba lekovitih i drugih biljaka samo na osnovu empirijskih podataka, danas je potvrđena brojnim hemijskim, farmakološkim i toksikološkim ispitivanjima. To je omogućilo da se fitoterapija direktno uključi i u konvencionalnu terapiju. U fitoterapiji se primenjuju cele lekovite i druge biljke, njihovi delovi – droge sa strukturom odn. organizovane droge (osušeni i usitnjeni nadzemni i podzemni organi biljke) i droge bez strukture odnosno nećelijske droge (mlečni sok, etarsko ulje, vosak, sluz, balzam), kao i različiti sastojci i pripravci. Primenom pojedinih biljaka koje sadrže farmakološki aktivne sastojke (heterozide, alkalioide, tanine, saponozide) i pojedine nutritivne elemente (eterična ulja, vitamine, minerale, antioksidanse) može se uticati na jačanje odbrambenih sposobnosti organizma, na metaboličke procese i na uspešnije odstranjivanje štetnih materija iz organizma.

Stimulacija funkcija imunskog sistema primenom biljnih preparata važna je, posebno zbog činjenice da je u svim zemljama Evropske unije, od početka 2006. godine, zabranjeno korišćenje antibiotika u krmnim smešama kao profilaktičkih supstanci i kao stimulatora rasta. Zakonom o organskoj proizvodnji Republike Srbije (2002) zabranjena je upotreba antibiotika, kokcidiostatika, biostimulatora, hormona ili bilo kojih drugih materija kojima se stimuliše rast ili proizvodnja da bi neki proizvod imao oznaku organski proizvedene hrane. Istovremeno se fitoterapeutičima (ekstraktima biljaka, esencijama) i homeopatskim proizvodima (biljnim, životinjskim i mineralnim supstancama) daje prednost nad sintetičko-hemijskim veterinarskim preparatima u zdravstvenoj zaštiti životinja, ukoliko obezbede da njihovi terapijski efekti budu pozitivni (Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje, 2002). Postoje i toksične biljke koje se u tradicionalnoj i konvencionalnoj medicini koriste kao lekovite, u cilju podsticanja nespecifičnih i specifičnih odbrambenih mehanizama organizma, čime se povećava otpornost na bolesti i jedinke se na taj način štite od infekcija. U našoj zemlji, naročito u brdsko-planinskim krajevima, raste više vrsta kukureka (*Helleborus odoratus* Waldst. et Kit., *Helleborus niger* L., *Helleborus multifidus* Vis., *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *Helleborus serbicus* Adamović i dr.) koje pripadaju redu narkotičnih i otrovnih biljaka. Sveži delovi ovih biljaka se ne smeju koristiti jer može doći do neželjenih efekata kao što su: nesvestica, povraćanje, dijareja, grčevi i ukočenost, pa i smrt, kod životinja ili ljudi. U etnoveterinarskoj medicini se upotrebljava biljna droga *Helleborus* sp. (*Ranunculaceae*), koja predstavlja osušen rizom (podzemno stablo) gusto obrastao kratkim, tankim korenjem mrke boje (*Hellebori rhizoma et radix*). Nespecifična nadražajna terapija primenjivana je

je u našem narodu (Tucakov, 1996), kao i u rumunskoj i makedonskoj tradicionalnoj medicini (Bogdan i sar., 1990; Tosevski i sar., 2004) transkutanom implantacijom rizoma kukureka. Postupak zatravljivanja životinja ili uvlačenja spreža sprovodi se postavljanjem dobro opranog i osušenog rizoma u ranu napravljenu debelom iglom (šilom) kroz uho ovaca i svinja, đerdan goveda i kožu grudi kod konja. Na mestu implantacije pojavljuju se crvenilo i otok, koji traju nedelju dana, pri čemu je opšte stanje životinja dobro. Ovoj prirodnoj metodi lečenja, se podvrgavaju nedovoljno razvijena grla kod kojih je uočeno odsustvo apetita, kao i životinje obbolele od hroničnih bolesti u cilju akutiziranja procesa radi bržeg ozdravljenja. Bogdan i sar. (1990) su ispitivali ovaj vid nespecifične nadražajne terapije kod većeg broja različitih domaćih životinja. Analizom diferencijalne krvne slike, ovi autori su utvrdili izraženu leukocitozu i neutrofiliju kod svih tretiranih životinja koja je trajala više od 6 dana (izuzev kod ovaca). U istraživanjima Davidović i sar. (2006, 2008, 2009, 2010) utvrđeno je da subkutana, intraperitonealna i intramuskularna aplikacija različitih doza ekstrakta podzemnih organa *Helleborus odoratus* W. et K. pacovima soja Wistar ima za posledicu značajno povećanje ukupnog broja leukocita i neurofilnih granulocita i aktivaciju brzih, nespecifičnih odbrambenih mehanizama. Koren i rizom velikog broja biljnih vrsta roda *Helleborus* sp. se koriste u lečenju pneumonije i bronhitisa kod goveda (Raimondo i Lentini, 1990; Passalacqua i sar., 2006), infektivnih bolesti svinja i ovaca (Guarrera, 1990) i protiv zubobolje (Leporatti i Pavesi, 1989). Utvrđeno je da prečišćeni ekstrakt *Helleborus* L. deluje imunostimulatorno i proinflamatorno (Kerek, 1997) i da modifikuje imunski odgovor u stanjima primarne ili sekundarne imunodeficijencije (Bolte i sar., 2001).

Hellebori rhizoma et radix sadrži bufadienolidne heterozide (Karrer, 1943; Wissner i Kating, 1974; Petričić i sar., 1977; Watanabe i sar., 2003), triterpenske i steroidne saponozide (Ribár i sar., 1986; Liedke i sar., 1997; Rosselli i sar., 2009), masne materije i masne kiseline (Argay i sar., 1996), ekdisteroide (Colombo i Tomé, 1993), alkaloidne (Slavík, 1987) i ugljene hidrate (Živanov-Stakić i Mladenović, 1971). Saponozidi imaju jako nadražajno dejstvo, podstiču kontrakcije buraga i ubrzavaju motilitet creva i uterusa, pa se kukurek u narodnoj medicini koristi kao purgativ, kao lokalno kontraceptivno sredstvo i za izazivanje abortusa. Iz pojedinih vrsta kukureka izolovane su različite aglikonske komponente steroidnih saponozida (sapogenini), površinski aktivnih jedinjenja koja smanjuju napon na dodirnoj površini dve faze koje se ne mešaju. Na ovoj osobini se zasnivaju biološka i farmakološka delovanja saponozida, koji se vezuju za sterole ćelijskih membrana i povećavaju njihovu permeabilnost, što se kod eritrocita manifestuje hemolizom i gubitkom hemoglobina. Petričić i sar. (1971) su uporednim ispitivanjem hemolitičkog delovanja saponozida iz podzemnih delova većeg broja vrsta roda *Helleborus* L., u *in vitro* uslovima, utvrdili veliku razliku ne samo između pojedinih vrsta, već i u okviru iste vrste sa različitih staništa. Pri tome, hemolitičko delovanje nije bilo u korelaciji sa količinom različitih saponozida, već je zavisilo od njihove strukture i moglo se višestruko povećati dodavanjem enzimskog sistema

koji sadrži β -glikozidazu. Najintenzivniju hemolizu, čak i u velikom razređenju, izazivaju saponini sa razgranatim ugljenohidratnim lancem od 4 do 5 monosaharida.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ogledne životinje. Ogled je izveden u eksperimentalnim uslovima na 49 pacova soja Wistar, oba pola, starosti dva meseca, telesne mase 200 ± 10 g. Formirano je 7 grupa sa po 7 jedinki (jedna kontrolna i šest oglednih grupa). Kontrolnoj grupi pacova (Grupa I) je intramuskularno aplikovan fiziološki rastvor u količini od 0,25 ml/100 g t.m., što je odgovaralo zapremini aplikovanog ekstrakta. U cilju određivanja dužine trajanja efekta ekstrakta rizoma i korena kukureka (EK) na crvenu krvnu sliku, pacovima je intramuskularno aplikovan (IM) u zadnji ekstremitet tečni EK u koncentraciji od 10 mg/100 g t.m., a krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom nakon 24h (Grupa II), 48h (Grupa III) i 72h (Grupa IV). Ispitivan je i uticaj delovanja povišene temperature na uočene efekte ekstrakta, 24h posle IM aplikacije inaktivisanog (56°C 30 min) (Grupa V) ili denaturisanog ekstrakta (100°C 5 min) (Grupa VI). Efekat dijalizata ekstrakta rizoma i korena kukureka na vrednosti parametara crvene krvne loze, ispitan je 24h posle njegove IM aplikacije (Grupa VII).

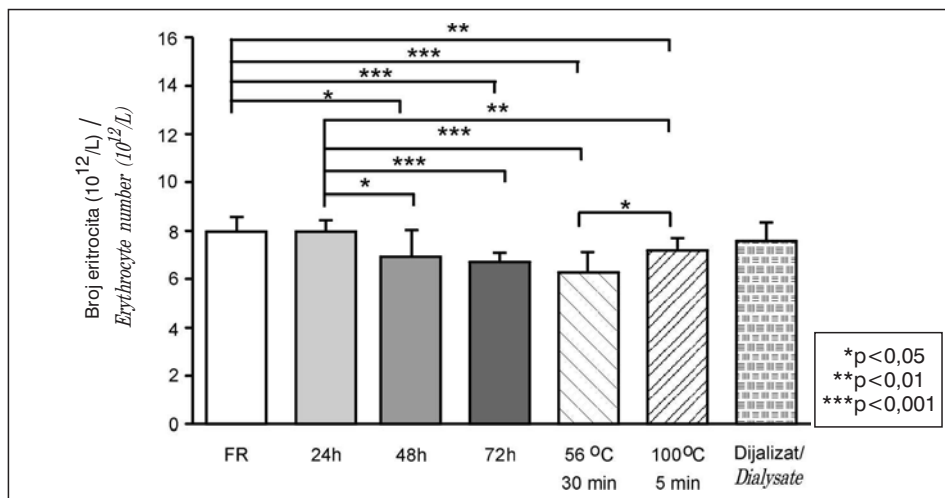
Postupak ekstrakcije. Osušen rizom sa korenjem *H. odoratus* W. et K., prethodno usitnjen do konzistencije grubog praška, ekstrahovan je u aparatu za kontinuiranu ekstrakciju prema Soxhlet-u rastvaračima rastuće polarnosti: petroletrom, hloroformom i metanolom. Ekstrahovani biljni materijal je potom dva puta ekstrahovan vodom, a kao krajnji proizvod dobijen je suvi ekstrakt žuto-okere boje koji je rastvaran u fiziološkom rastvoru do potrebne koncentracije. Dijalizat EK je dobijen nakon trostepene dijalize u celofanskoj vrećici (cut off 12 kDa).

Određivanje vrednosti parametara crvene krvne slike. Vrednosti hematoloških parametara: broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita (HCT) određivani su pomoću automatskog hematološkog analizatora Arcus Diatron®, GmbH Wien, Austria. Testiranje značajnosti ustanovljenih razlika između srednjih vrednosti ispitivanih hematoloških parametara izvršeno je Studentovim-t testom.

Rezultati istraživanja i diskusija / *Results and Discussion*

Tokom ogleda, najveći prosečan broj eritrocita utvrđen je kod kontrolne grupe pacova ($7,93 \pm 0,50 \times 10^{12}/\text{L}$). Kod svih oglednih grupa kojima je aplikovan EK došlo je do smanjenja broja eritrocita u odnosu na kontrolnu grupu, a razlika nije bila statistički značajna samo 24h posle aplikacije EK i dijalizata EK (između kojih takođe nije utvrđena statistička značajnost). Ispitivanjem uticaja EK na promenu broja eritrocita u određenom vremenskom periodu, utvrđen je najveći broj eritrocita 24h posle aplikacije EK ($7,92 \pm 0,50 \times 10^{12}/\text{L}$) što je značajno

više u odnosu na ove vrednosti posle 48h ($6,91 \pm 1,08 \times 10^{12}/L$) i posle 72h ($6,67 \pm 0,38 \times 10^{12}/L$). Prosečna vrednost broja eritrocita u krvi pacova II grupe 24h posle tretmana EK bila je značajno veća u odnosu na ove vrednosti kod jedinki kojima je aplikovan denaturisan ($7,09 \pm 0,44 \times 10^{12}/L$) ili inaktivisan ekstrakt ($6,24 \pm 0,69 \times 10^{12}/L$) (grafikon 1).

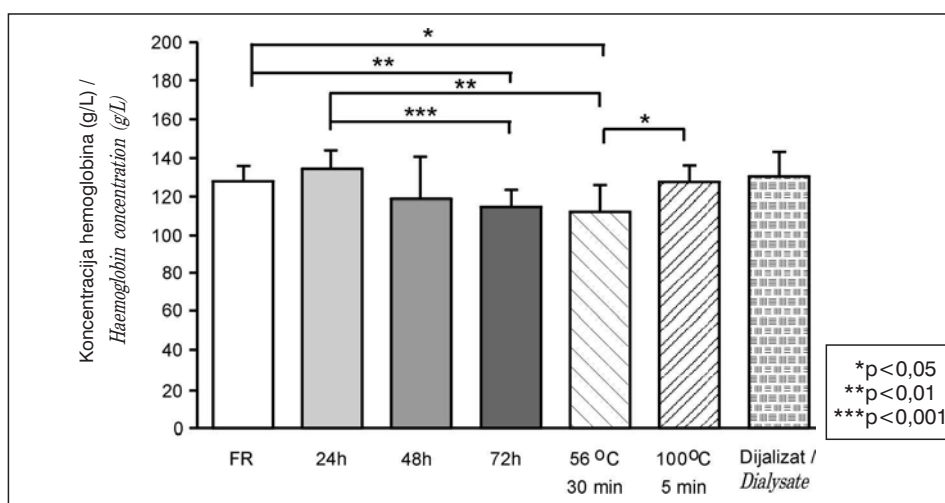


Grafikon 1. Broj eritrocita ($10^{12}/L$) kod pacova tokom ogleda /
Graph 1. Number of erythrocytes ($10^{12}/L$) in rats during experiment

U svim ispitivanim grupama, prosečan broj eritrocita je bio u granicama referentnih vrednosti koje navode Pritchett i Corning (2004) ($5,4-8,5 \times 10^{12}/L$) i Moore (2000) ($7,25 \pm 0,93 \times 10^{12}/L$ kod mužjaka i $6,85 \pm 0,61 \times 10^{12}/L$ kod ženki). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Petričića i sar. (1971) koji navode da *H. odoratus* W. et K. ispoljava slabu hemolitičku aktivnost (HD u Ph Jug. Sap.jed./g droge), koja je niža u poređenju sa drugim biljkama roda *Helleborus* L. Međutim, značajno povećanje stepena hemolize u krvi pacova tokom određenog vremenskog perioda (48h i 72h posle aplikovanja EK) nije u saglasnosti sa rezultatima ovih autora koji su posmatrajući dinamiku hemolize u *in vitro* uslovima utvrdili da se hemoliza uglavnom odvija u prva 3h i da posle toga nema bitnih promena. Ristoska i sar. (2002) navode da se prosečan broj eritrocita u krvi nazimica smanjio 24h posle aplikovanja EK, ali da se održao u fiziološkim granicama. Rezultati Tosevskog i sar. (2004) dobijeni na prasadi u starosti 52 dana ukazuju na smanjenje broja eritrocita za 22% druge i treće nedelje nakon aplikacije EK, dok je kod prasadi u uzrastu od 35 dana broj eritrocita bio povećan prve i druge nedelje posle tretmana.

Koncentracija hemoglobina u krvi pacova kontrolne grupe bila je $127,71 \pm 8,12$ g/L. U II ogleđnoj grupi, 24h posle aplikacije EK ili aplikacije dijal-

zata EK (grupi VII) ove vrednosti su bile nešto veće ($134,29 \pm 9,20$ g/L odn. $129,29 \pm 13,00$ g/L) u odnosu na kontrolnu grupu. Ove razlike nisu bile statistički značajne. Ostale ogledne grupe su imale niže vrednosti koncentracije hemoglobina u odnosu na kontrolnu grupu, a statistički značajne razlike zabeležene su u odnosu na IV grupu 72h posle aplikacije EK ($114,71 \pm 7,06$ g/L) i u odnosu na V grupu tretiranu EK inaktivisanim 30 min na 56°C ($111,29 \pm 13,94$ g/L). Značajno veća koncentracija hemoglobina je zabeležena u VI grupi pacova posle aplikacije EK denaturisanog 5 min na 100°C ($126,57 \pm 7,85$ g/L) u odnosu V grupu koja je dobila inaktivisani EK ($p < 0,05$) (grafikon 2).

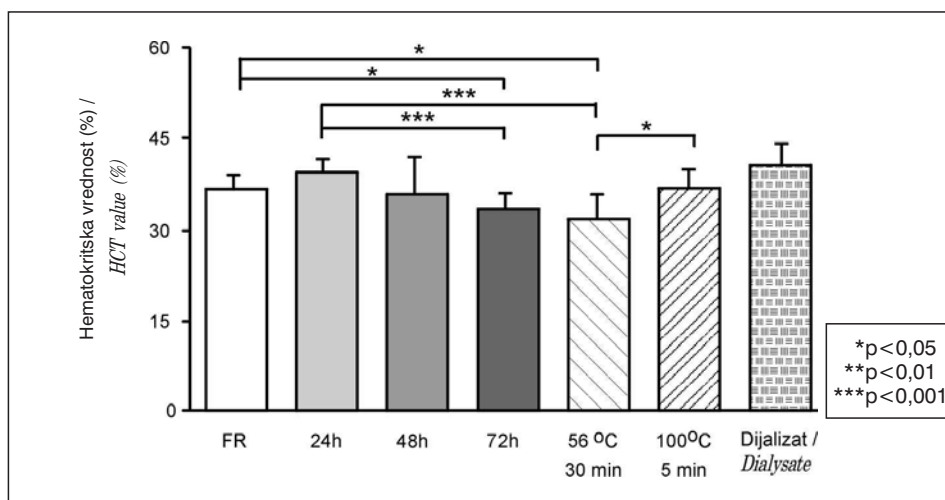


Grafikon 2. Koncentracija hemoglobina (g/L) kod pacova tokom ogleda /
Graph 2. Haemoglobin concentration (g/L) in rats during experiment

U odnosu na fiziološke vrednosti za koncentraciju hemoglobina u krvi pacova, koje iznose 143 ± 10 g/L (Moor, 2000), tokom ogleda su utvrđene niže vrednosti kod kontrolne i oglednih grupa pacova. Tosevski i sar. (2004) su utvrdili smanjenje koncentracije hemoglobina u proseku za 11% kod prasadi u starosti od 52 dana, četrnaestog i dvadeset prvog dana posle aplikacije EK. Rezultati dobijeni na pacovima nisu u saglasnosti sa rezultatima Tosevskog i sar. (2004), koji su kod prasadi uzrasta od 35 dana konstatovali hemoglobinemiju u okviru fizioloških granica pre i posle aplikovanja EK, kao ni sa rezultatima Ristoske i sar. (2002), koji su takođe utvrdili da je vrednost koncentracije hemoglobina ostala u granicama referentnih vrednosti posle aplikovanja EK nazimicama.

Najveća hematokritska vrednost je zabeležena u VII grupi pacova 24h posle aplikovanja dijalizata EK ($40,31 \pm 3,93\%$), a razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($36,89 \pm 2,19\%$) i II grupu 24h posle aplikovanja EK ($39,34 \pm 2,24\%$) nije bila statistički značajna. Praćenjem uticaja EK na HCT utvrđeno je da je samo u ogled-

noj grupi IV (72h posle primene EK) hematokriti bio $33,31 \pm 2,33\%$, što je značajno niža vrednost u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$). Nakon termičke obrade i primene EK, utvrđena je značajno niža HCT posle aplikacije inaktivisanog EK ($31,86 \pm 3,80\%$) u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), II grupu 24h posle aplikacije EK ($p < 0,001$) i VI grupu kojoj je aplikovan denaturisan EK ($p < 0,05$) (grafikon 3).



Grafikon 3. Hematokritska vrednost (%) kod pacova tokom oglada /
Graph 3. Haematocrit value (%) in rats during experiment

Hematokritske vrednosti u krvi pacova ispitivanih grupa bile su nešto niže od referentnih vrednosti 37-49%, koje navode Pritchett i Corning (2004). Rezultati dobijeni na pacovima 24h posle primene EK u skladu su sa ispitivanjem hematokritske vrednosti na nazimicama 24h posle aplikacije EK koje su sproveli Ristoska i sar. (2002), pri čemu su utvrdili da je ova vrednost ostala u granicama fiziološkog opsega.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata naših istraživanja može se zaključiti sledeće:

1. Intramuskularna aplikacija ekstrakta rizoma i korena *Helleborus odoratus* W. et K. ima za posledicu smanjenje broja eritrocita kod svih oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu pacova, ali su dobijene vrednosti bile u referentnim granicama za ovu životinjsku vrstu.

2. Tokom oglada su utvrđene niže vrednosti koncentracije hemoglobina i hematokrita kod svih ispitivanih grupa u odnosu na fiziološke vrednosti.

Korišćeni ekstrakt nije uticao značajno na vrednosti ovih parametara, osim kod IV grupe (72h posle aplikacije EK) i V grupe (inaktivisani EK), kod kojih su utvrđene značajno niže vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu i II grupu pacova 24h nakon primene EK.

3. Ekstrakt podzemnih organa *H. odoratus* W. et K. ispoljava slabu hemolitičku aktivnost.

Literatura / References

1. Argay G, Kálmán A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Ribár B. Crystal structure of stigmast-5-en-3 β -ol monohydrate, C₂₉H₅₂O₂. Zeitschrift für Kristallographie 1996; 211: 725-7.
2. Bogdan I, Nechifor A, Basea I, Hruban E. Aus der rumänischen Volksmedizin: Unspezifische Reiztherapie durch transkutane implantation der Nieswurz (*Helleborus purpurascens*, Fam. *Ranunculaceae*) bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Dtsch Tierärztl Wschr 1990; 97, 12: 525-9.
3. Bolte S, Petrut H, Trif R. Imunostimularea cu extract de *Helleborus* spp. Lucrari stiintifice med vet, Timisoara 2001; 34: 79-86.
4. Colombo ML, Tomè F. Ecdysteroid Production in *Helleborus odoratus* ssp. *laxus*: Response to Different Environments. Int J Pharmacogn 1993; 31, 4: 311-5.
5. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Hristov S, Relić R, Stanković B. Uticaj ekstrakta rizoma i korena kukureka (*Helleborus odoratus* Waldst. et Kit.) na povećanje odbrambenih sposobnosti organizma. XVII Inovacije u stočarstvu, 16-17. novembar 2006. god., Beograd. Biotehnologija u stočarstvu 2006; 22: 773-80.
6. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Maksimović Z, Jovanović M. Primena *Helleborus* L. i drugog bilja u profilaksi i terapiji bolesti životinja. Lekovite sirovine 2008; 28: 63-9.
7. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Jovanović M. Uticaj ekstrakta kukureka (*H. odoratus* W. et K.) na neke parametre krvne slike Wistar pacova. XI regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja. Clinica veterinaria Subotica, 19-21. jun 2009; 127-8.
8. Davidović V, Lazarević M, Joksimović-Todorović M, Jovanović M. Imunomodulatorno delovanje ekstrakta podzemnih organa kukureka (*Helleborus odoratus* W. et K.) kod Wistar pacova. XV savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem Čačak. Zbornik radova, 26-27. mart 2010; 15(17): 547-52.
9. Guarrera PM. Use tradizionali delle piante in alcune aree marchigiane. Informatore Botanico Italiano 1990; 22: 155-67.
10. Karrer W. Über Hellebrin, ein krystallisiertes Glykosid aus Radix Hellebori nigri, Helvetica Chimica Acta 1943; 26: 1353-67.
11. Kerek F. Offenlegungsschrift, Patentnummer: DE 196 00 301 A1, Bioregulatorischer Wirkstoff, Verfahren zu seiner Herstellung sowie dessen Verwendung, Deutsches Patentamt. München, Germany, 1997.
12. Köhler-Rollefson I, Bräunig J. Antrophological veterinary medicine: The need for indigenizing the curriculum. Proceedings of the 9th AITVM Conference Harrare, Sep 14-18, 1998.

13. Leporatti ML, Pavesi A. Usi nuovi, rari o interessanti di piante officinali di alcune yone delle Calabria. Webbia 1989; 43: 269-89.
14. Liedtke S, Lorch E, Goedings P, Wichtl M. Isolierung von β -Ecdyson und Macranthosid I aus Wurzeln und Rhizomen von *Helleborus niger* subsp. *niger* (Ranunculaceae). Pharmazie 1997; 52: 964-5.
15. Moore MD. Chapter 189: Hematology of the Rat (*Rattus norvegicus*). In: Feldman FB et al., editors. Fifth edition Schalm's Veterinary Hematology. Copyright © 2000 Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
16. Passalacqua NG, De Fine G, Guarrera PM. Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region (Southern Italy). J Ethnobiol Ethnomed 2006; 2: 52.
17. Petričić J, Tarle D, Abinun S. Hemolitička djelotvornost nekih vrsta roda *Helleborus*, Acta Pharm Jug 1971; 21: 71-8.
18. Petričić J, Tarle Đ, Knežević E. Helleborus chemotypes from Yugoslavia recognizable by hellebrin contents. Acta Pharm Jug 1977; 27: 127-9.
19. Pravilnik o metodama organske stočarske proizvodnje, "Službeni list SRJ", br. 51/2002, Zakona o organskoj poljoprivredi. "Službeni list SRJ" 28/2000.
20. Pritchett KR, Corning BF. Biology and Medicine of Rats. In: Reuter JD and Suckow MA, editors. Laboratory Animal Medicine and Management. International Veterinary Information Service. Ithaca NY, 2004 (www.ivis.org).
21. Raimondo FM, Lentini F. Indagini etnobotaniche in Sicilia. I Le piante della flora locale nella tradizione popolare delle Madonie (Palermo). II Naturalista Siciliano 1990; 3-4: 77-99.
22. Ribár B, Kapor A, Vladimirov S, Živanov-Stakić D, Argay G, Kálmán A. Structure of Spirosta-5,25(27)-diene-3 β ,11 α -diol. Acta Cryst 1986; C42: 1780-2.
23. Ristoska D, Tosevski J, Ulčar I. Use of the *Helleborus odoratus* extract in early detection of pathological conditions in pig production. Proceedings of the 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology; Grugliasco (Turin) Italy, 2002: 215.
24. Rosselli S, Maggio A, Bruno M, Spadaro V, Formisano C, Irace C, Maffettone C, Mascolo N. Furostanol Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from *Helleborus bocconeii* ssp. *intermedius*. Phytotherapy Research 2009; 23: 1243-9.
25. Slavik J, Bochoráková J, Slaviková L. Occurrence of magnoflorine and corytuberine in some wild or cultivated plants of Czechoslovakia. Collection Czechoslovak Chem Commun 1987; 52: 804-12.
26. Tosevski J, Ulčar I, Hajrulai-Musliu Z, Ristoska D, Lončarević A. Use of plant mitogenic compounds in veterinary practice. Proceedings of the 6th international Symposium in animal clinical pathology and therapy. Clinica veterinaria Budva, Jun 14-18 2004; 100-6.
27. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1996.
28. Watanabe K, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y. Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*. J Nat Prod 2003; 66: 236-41.
29. Wissner W, Kating H. Botanische und phytochemische untersuchungen an den Europäischen und Kleinasiatischen arten der gattung *Helleborus*, II. Vergleichende phytochemische Untersuchungen der Herzglykosid- und Saponin-Führung. Planta Medica 1974; 26: 228-49.

30. Živanov-Stakić D, Mladenović M. Identifikacija nekih ugljenih hidrata i steroida biljke *Helleborus odoratus* hromatografijom na tankom sloju. Arh farm 1971; 4: 187-91.

ENGLISH

INFLUENCE OF EXTRACTS OF *HELLEBORUS ODORUS* W. ET K. UNDERGROUND PARTS ON RED BLOOD CELL COUNT OF WISTAR RATS

Vesna Davidović, M. Lazarević, Mirjana Joksimović-Todorović, Z. Maksimović, M. Jovanović, N. Miljas

This paper presents the results of investigations of parameter values of the red blood cell count in Wistar rats, after intramuscular application of rhizome and root extract of *Helleborus odoratus* W. et K (HE). The trial was conducted in experimental conditions on 49 Wistar rats divided into 7 groups with 7 animals per unit (control and six experimental groups). The control group was treated by an intramuscular injection of sterile saline (0.25 ml/100 g BM). For the purpose of determining the duration of the HE effects, the animals were injected with a dose of 10 mg/100 g BM and blood was collected by cardiac taps after 24, 48 and 72 hrs. Moreover, we investigated the influence of elevated temperatures on the noted HE extract effects, 24 hrs after the application of the inactivated (56°C 30 min) or denatured (100°C 5 min) extract, as well as the influence of dialyzed HE. The obtained results of haematological analyses have pointed out the weak hemolyses activity of the extract. In all experimental groups, the erythrocyte count was decreased, but remained within reference values. Haemoglobin concentration and haematocrit values in the experimental and the control groups of rats were decreased in comparison to the physiological values, while the applied extract did not significantly affect the examined parameters.

Key words: *Helleborus* sp., red blood cell count parameters, rats

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *HELLEBORUS ODORUS* W. ET K. НА КРАСНУЮ КРОВЯНУЮ КАРТИНУ WISTAR КРЫС

Весна Давидович, М. Лазаревич, Миряна Йоксимович-Тодорович, З. Максимович, М. Йованович, Н. Миляс

В этой работе показаны результаты испытания стойкости параметров красной кровяной картины крыс штамма *Wistar*, после внутримышечной аппликации экстракта корня и корня *Helleborus odoratus* W et K. Опыт выполнен в экспериментальных условиях на 49 крыс штамма *Wistar*, разделенных в 7 групп с по 7 единичных животных (контрольная и шесть опытных). Контрольной группе крыс внутримышечно апплицирован физиологический раствор (0,25 мл/100 г м.т.). С целью определения длины продолжительности эффектов экстракта, крысам апплицирован жидкий экстракт подземных органов чемерицы в концентрации от 10 мг/100 г м.т., а кровь образчикована кардиальной пункцией после 24 ч, 48 ч. и 72 ч. Испы-

тывано и влияние экстракта подвергнутого повышенной температуре на замеченные эффекты, 24 ч. после аппликации инактивационного (56°C 30 мин) или денатурированного экстракта (100°C 5 мин), словно и эффект диализата экстракта. Полученные результаты гематологических анализов указали на слабую гемолитическую активность экстракта. У всех опытных групп, среднее число эритроцитов было уменьшено, но поддерживался в границах референтных стоимостей. Записаны концентрации гемоглобина и гематокрита в крови крыс контрольной и опытных групп были ниже в отношении физиологической стоимости, при чём использованный экстракт не значительно влиял на испытываемые параметры.

Ключевые слова: чемерица, красная кровяная лоза, крысы

**SUPKLINIČKI MASTITISI OVACA: UZROČNICI I NJIHOVA
OSETLJIVOST NA POJEDINE ANTIMIKROBNE LEKOVE******SUBCLINICAL MASTITIS IN SHEEP – CAUSES AND THEIR
SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS*****Slobodanka Vakanjac, I. Todorović****

Kalifornija mastitis testom (CMT) ispitano je mleko uzorkovano od 6609 ovaca, odnosno iz 13 218 mamarnih kompleksa. Od 986 uzoraka mleka sa povećanim brojem somatskih ćelija u mleku iz 910 (92,3%) uzoraka izolovani su uzročnici mastitisa. Najčešći izolovani mikroorganizmi su: *E. coli* izolovana iz 189 (20,76%) uzoraka, *Micrococcus* sp. iz 186 (20,43%) uzoraka, *Bacillus* sp. iz 177 (19,45%), *Staphylococcus aureus* iz 172 (18,9%) uzorka i *Proteus* sp. iz 121 (13,29%) uzoraka mleka ovaca. Koagulaza negativne stafilokoke (CNS) izolovane su u mnogo manjem broju iz 25 (2,74%) uzoraka, *Streptococcus* sp. izolovan je iz 19 (2,08%) uzoraka, *Pseudomonas* sp. iz 14 (1,53%) uzoraka, hemolitične *E. coli* izolovane su iz svega 6 (0,65%) uzoraka, a *Streptococcus agalactiae* iz samo jednog uzorka. Od 25 izolata koagulaza negativnih stafilokoka kao *Staphylococcus chromogenes* identifikovano je 16 (64%) izolata, a kao *Staphylococcus simulans* 9 (36%) izolata. Osetljivost izolovanih uzročnika mastitisa na antimikrobne lekove ispitana je disk difuzionom metodom.

Ključne reči: mastitis, ovce, Staphylococcus aureus, koagulaza negativne stafilokoke, antibiogram, antimikrobni lekovi

Uvod / Introduction

Uzročnici mastitisa ovaca su uglavnom infektivni, ređe mehanički ili hemijski (toksični) agensi. Kod ovaca mastitis uglavnom izazvaju *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, koagulaza negativne stafilokoke (CNS), *Arcanobacter pyogenes*, mikoplazme, pasterele, retko plesni i gljivice. *Staphylococcus aureus* se prenosi preko sekreta ovaca obolelih od mastitisa, ruku mužača i

* Rad primljen za štampu 24. 03. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Slobodanka Vakanjac, docent, Katedra za porodiljstvo, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; mr sci. med. vet. Igor Todorović, Veterinarski specijalistički institut, Pančevo, R Srbija

opreme za mužu. Prenosioci infekcije mogu biti i jaganjci na sisi, jer se kod njih ovi mikroorganizmi mogu naći na sluznici usta i nosa. *Staphylococcus aureus* javlja se najčešće u periodu laktacije i morbiditet se kreće od 10 do 30 % u stadu, mada neki autori beleže čak i do 65% (Mork, 2007). Latentna infekcija vimena ovaca utvrđena je u 40% pa i do 90% jedinki. Neki sojevi stafilokoka su sposobni da produkuju penicilinazu, zahvaljujući kojoj postaju otporni na dejstvo penicilina (Marković, 1982). Schröder i sar. (2005) su ustanovili da je *S. aureus* 100% osetljiva na oksacilin, cefacetril i neomicin, te ih preporučuju kod mastitisa izazvanih ovim mikroorganizmom. Corti (2003) je ustanovio da je kod 91% uzoraka mleka uzročnik bila bakterija *S. aureus*, koja je osetljiva na penicilin G, ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, linkomicin, neomicin, gentamicin i kanamicin. Kod stafilokoknog mastitisa mogu se koristiti i cefalosporini, makrolidi i tetraciklini (Pyorala, 2002). Linage (2008) je upotrebom preparata za zasušenje (penetamat hidrojodid, benetamin penicilina i frameticin sulfata) pojavu stafilokoknih mastitisa smanjio sa 41,3 na 9,9%. Veću osetljivost *S. aureus* na tilmikozin, nego na druge upotrebljene antibiotike utvrdio je Bergonier (2003). Simko (1996) je utvrdio da su sojevi *S. aureus* izolovani u slučajevima mastitisa ovaca osetljivi na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima, eritromicin, gentamicin, kanamicin, tetracikline i linkomicin, rezistentni prema penicilinu G i ampicilinu, a slabo osetljivi na cefalosporine, rifamicin i spiramicin. Kod ovaca mastitisi izazvani streptokokom (*Streptococcus sp.*) su retki i javljaju se u nekih 5 % slučajeva od ukupnog broja mastitisa. Češći su u uslovima nepravilne mašinske muže, kada su izazvani bakterijom *Streptococcus uberis*, pri čemu može biti inficirano i do 20% ovaca u stadu (Krzyscin, 2007). Kod ove infekcije upotreba penicilinskih preparata daje uglavnom zadovoljavajuće rezultate, tako da se kod kliničke forme mastitisa aplikuju visoke doze penicilina G ili polusintetskog penicilina (Gruneth, 1996). Redukcija pojave streptokoknih mastitisa (sa 5,8 na 1,8%) postignuta je kombinacijom preparata za zasušenje i to pentamat hidrojodida, benetamin penicilina i frameticin sulfata (Linage, 2008). Koagulaza negativne stafilokoke kao nespecifični izazivači mastitisa, javljaju se u sve većem procentu u stadu. Uočeno je sezonsko variranje mastitisa prouzrokovanih koagulaza negativnim stafilokokama i češće se javljaju pred kraj sezone boravka u stajama (Gonzales, 2003). Jedan od češćih CNS je *Staphylococcus chromogenes* (*S. chromogenes*) koja često naseljava vrh sisa (Burriel, 1988). Prema podacima iz literature, najčešće izolovane CNS iz mleka ovaca su bakterije *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans* (prisutna je najčešće kod mesnatih rasa ovaca) i *S. chromogenes* (Burriel, 1988). Neki radovi ukazuju na to da je *S. chromogenes* prisutna čak na 20% vrhova papila ovaca (De Vliger, 2003).

Materijal i metode rada / Material and methods

Kalifornija mastitis test (CMT) / California mastitis test (CMT)

Kalifornija mastitis testom (CMT) ispitano je mleko uzrokovano od 6609 ovaca, odnosno mleko iz 13 218 mamarnih kompleksa.

Bakteriološko ispitivanje mleka / Bacteriological examination of milk

U laboratoriji VSI Pančevo bakteriološki je ispitano 986 uzoraka mleka ovaca koji potiču iz onih mamarnih kompleksa kod kojih je CMT-om utvrđen porast broja somatskih ćelija. Uzorci mleka su uzeti u aseptičnim uslovima. Uzorci koji su prethodno čuvani u frižideru, pre zasejavanja su zagrevani u vodenom kupatilu 15 minuta na 37° C, a zatim su zasejavani na krvni agar. Zasejane podloge su inkubirane u termostatu 24 do 48 h pri 37 ° C. Uzročnici mastitisa su identifikovani na osnovu izgleda kolonija, vrste hemolize i biohemijskih karakteristika.

Ispitivanje osetljivosti izolovanih uzročnika mastitisa na antimikrobne lekove / Investigation of sensitivity to antibiotics of the isolated mastitis causes

Određivanje osetljivosti uzročnika mastitisa na antimikrobne lekove je vršeno disk difuzionom metodom. Na površinu Mueller–Hinton agara naneta je suspenzija bakterija, a zatim su pincetom stavljane tablete po ploči. Interpretacija rezultata je vršena po preporuci proizvođača. Postoje tri kategorije osetljivosti uzročnika, a to su :

- S – osetljiv – infekcija izazvana osetljivim uzročnicima i leči se propisanim dozama od strane proizvođača,
- I – umereno osetljiv – koristite povećane doze antimikrobnih lekova jer je uzročnik na njega umereno osetljiv,
- R – infekcija izazvana rezistentnim sojem i ne leči se datim antimikrobnim lekom.

Kod izrade antibiograma koristili smo sledeće antibiogram diskove: tetracikline, gentamicin, linkomicin + spektinomycin, eritromicin, penicilin G, ampicilin, trimetoprim + sulfametoksazol, enrofloksacin, neomicin.

Rezultati rada / Results

Na farmama ovaca južnog Banata sa visokim godišnjim procentom supkliničkih i kliničkih mastitisa, izvršen je pregled mleka Kalifornija mastitis testom (CMT) u cilju identifikacije grla kod kojih postoji poremećaj sekrecije mleka. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Ukupan broj pregledanih ovaca i mamarnih kompleksa Kalifornija mastitis testom / Table 1. Total number of examined sheep and mammary complexes using California mastitis test

Broj pregledanih ovaca CMT / Number of sheep examined using CMT	Broj pregledanih mamarnih kompleksa CMT / Number of examined mammary complexes using CMT	Broj ovaca pozitivnih na CMT / Number of sheep positive to CMT
6 609	13 218	986 (14,91%)

Pozitivno na CMT bilo je 986 ovaca, odnosno 14,91% pregledanih ovaca je pokazalo povećan broj SCC posle testiranja CMT-om. Od ukupno 986 uzoraka mleka koji su bili pozitivni na Kalifornija mastitis testu, 910 (92,3%) uzoraka mleka je posle zasejavanja na hranjive podloge pokazalo rast patogenih i saprofitskih mikroorganizama. Samo 76 (7,7%) uzoraka mleka, iako je bilo pozitivno na CMT, posle inkubacije na hranjivim podlogama nije pokazalo rast mikroorganizama.

Tabela 2. Rezultati izolacije mikroorganizma iz uzoraka mleka ovaca /
Table 2. Results of isolation of microorganisms from sheep milk samples

Izolovani mikroorganizam / <i>Isolated microorganisms</i>	Broj izolovanih mikroorganizama / <i>Number of isolated microorganisms</i>	Procenat izolovanih mikroorganizama / <i>Percentage of isolated microorganisms</i>
<i>Escherichia coli</i>	189	20,76
<i>Micrococcus sp.</i>	186	20,43
<i>Bacillus sp.</i>	177	19,45
<i>Staphylococcus aureus</i>	172	18,90
Koagulaza negativne stafilocoke / <i>Coagulase-negative staphylococci</i>	25	2,74
<i>Proteus sp.</i>	121	13,29
<i>Streptococcus sp.</i>	19	2,08
<i>Pseudomonas</i>	14	1,53
<i>Escherichia coli hemoliticus</i>	6	0,65
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,10
Ukupno / <i>Total</i>	910	100%

Iz 910 uzoraka mleka ovaca kao uzročnici mastitisa izolovani su: *E. coli* iz 189 (20,76%) uzoraka, *Micrococcus sp.* iz 186 (20,43%) uzoraka, *Bacillus sp.* iz 177 (19,45%) uzoraka, *Staphylococcus aureus* iz 172 (18,9%) uzorka i *Proteus sp.* iz 121 (13,29%) uzorka. Kaagulaza negativne stafilocoke (CNS) izolovane su u mnogo manjem broju iz 25 (2,74%) uzoraka, *Streptococcus sp.* izolovan je iz 19 (2,08%) uzoraka, *Pseudomonas sp.* je izolovan iz 14 (1,53%) uzoraka, hemolitična *E. coli* izolovana je svega iz 6 (0,65%) uzoraka i *Streptococcus agalactiae* iz samo jednog uzorka (tabela 2).

Od ukupno 910 uzoraka mleka ovaca, u 197 uzoraka su izolovane stafilocoke, što iznosi oko 21,6% od ukupnog broja izolovanih mikroorganizama. Bakterija *S. aureus* je izolovana iz 172, odnosno u 18,6% uzoraka mleka. Koagulaza negativne stafilocoke (CNS) izolovane su iz 25 (2,7%) uzoraka mleka ovaca (tabela 3).

Tabela 3. Nalaz izolovanih stafilocoka iz mleka ovaca /
Table 3. Findings of isolated staphylococci from sheep milk

Ukupno uzoraka mleka / Total milk samples	Broj uzoraka sa izolovanim stafilocokama / Number of samples with isolated staphylococci	Broj izolovanih <i>S. aureus</i> iz mleka / Number of isolated <i>S. aureus</i> from milk	Izolovane koagulaze negativne stafilocoke / Isolated coagulase-negative staphylococci	Izolovani <i>S. chromogenes</i> / Isolated <i>S. chromogenes</i>	Izolovani <i>S. simulans</i> / Isolated <i>S. simulans</i>
910	197 (21,6%)	172 (18,9%)	25 (2,7%)	16 (64%)	9 (36%)

Tabela 4. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih mikroorganizama na antibiotike /
Table 4. Results of investigations of sensitivity of isolated microorganisms to antibiotics

Izolovani mikroorganizmi Isolated microorganisms	Tetra- ciklin / Tetra- cycline	Genta- micin / Genta- micin	Eritro- micin / Eritro- micin	Linkomicin + spektinomycin / Lincomycin + spectinomycin	Visoke doze penicilina / High doses of penicillin	Penicilin / Penicillin	Ampicilin / Ampicillin	Trimetoprim + sulfa / Trimet hoprim + sulpha	Enrofloxacin / Enrofloxacin	Neo- micin / Neo- mycin
<i>Bacillus</i> sp	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>E. coli</i>	R (i)	S	R	I	R	R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> hemoliticus	R	S	R	R	R	R	I	S	I	I
<i>Pseudomonas</i> sp	R	S	I	R	R	R	R	R (i)	S	S
<i>Proteus</i> sp	I	S	R	R	I	R	I	I	S	S
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	R	S	I	I	S (i)	R	R	S	I	S
<i>Mikrococcus</i>	R	R	S	I	S	S	S	R	R	R
<i>Str. agalactiae</i>	I	I	R	R	S	S	S	S (i)	I	I
Koagulaza neg stafil. / Coagulase- neg staphyl.	R	S	R	I	I	R	I	R	R	I

Legenda / Legend: S – osetljiv / sensitive, I – umereno osetljive / moderately sensitive, R – rezistentne / resistant

Od ukupno 25 izolovanih kaogulaza negativnih stafilokoka, u 16 (64%) uzoraka mleka izolovan je *Staphylococcus chromogenes*, a iz 9 (36%) uzoraka mleka izolovan je *Staphylococcus simulans*.

Osetljivost izolovanog uzročnika mastitisa ovaca prema određenom antimikrobnom leku je u tabeli 4 definisana na osnovu istovetno dobijenih rezultata antibiograma u preko 80% slučajeva za dati mikroorganizam odnosno antimikrobni lek.

Prema rezultatima antibiograma izolati *Bacillus sp.* su bili osetljivi na penicilin, ampicilin, eritromicin i linkomicin + spektinomycin, sojevi *E.coli* su bili osetljivi na gentamicin, ampicilin, kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol, enrofloksacin i neomicin, a hemolitične *E. coli* su bile osetljive na gentamicin i kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol. Izolati *Pseudomonas sp.* su bili osetljivi na gentamicin, enrofloksacin i neomicin. Izoloti *Proteus sp.* su bili osetljivi na gentamicin, enrofloksacin i neomicin. *Staphylococcus aureus* je bio osetljiv na gentamicin, trimetoprim + sulfametoksazol i neomicin, a umereno osetljiv na visoke doze penicilina. Izolati *Micrococcus sp.* su bili osetljivi na penicilin G, ampicilin i eritromicin. Bakterija *Streptococcus agalactiae* je bila osetljiva na penicilinske preparate i kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol. Koagulaza negativne stafilokoke su bile osetljive na gentamicin i umereno osetljive na eritromicin, visoku dozu penicilina G, ampicilina, neomicina i kombinaciju linkomicin + spektinomycin.

Kod ponovne kontrole mleka nakon sprovedene terapije i isteka karence odnosno, nakon deset dana od završetka terapije, antimikrobni lekovi koje smo koristili prema rezultatima antibiograma dali su zadovoljavajući učinak.

Diskusija / Discussion

U toku izvođenja ovog rada ukupno je pregledano 6 609 ovaca Kalifornija mastitis testom, pri čemu je pozitivno bilo 986 ovaca, odnosno 14,91% grla je pokazalo povećan broj SCC u mleku. Naši rezultati su veoma slični rezultatima do kojih je došao Kaisler (1992), koji je u mleku ispitivanih ovaca (ukupno 17% grla) pomoću CMT utvrdio povećani broj SCC (preko 2 miliona). Za razliku od navedenog autora i našeg iskustva, Bergonier (2003) je u mleku farmera pomoću CMT dijagnostikovao čak 57% grla sa povećanim brojem SCC.

Od ukupno 910 uzoraka mleka, *E. coli* je izolovana iz 189 (20,76%) uzoraka, što je u saglasnosti sa nalazom Krzyscina (2007), koji je *E.coli* izolovao u 21,7% slučajeva supkliničkih mastitisa ovaca, a manje od nalaza Bergoniera (2003), koji je *E.coli* izolovao u svega 4% supkliničkih mastitisa ovaca.

Staphylococcus aureus je izolovan iz 172 (18.9%) uzorka mleka u stadu, što je manje od nalaza Krzyscina (2007), koji je izolovao *Staphylococcus sp.* iz 36,7% uzoraka mleka ovaca i Morka (2007), koji je utvrdio nalaz ovog mikroorganizma čak i do 65% u uzorcima mleka sa supkliničkim mastitisima, za razliku od

Lafia (1998), koji je izolovao *S. aureus* iz 6,8% uzoraka mleka ovaca sa supkliničkim mastitisima i Bergoniera (2003), koji je izolovao *S. aureus* svega iz 4% uzoraka.

Kaogulaza negativne stafilokoke (CNS) izolovane su iz 25 (2,74%) uzoraka, što je manje od nalaza Pengova (2001), koji je kaogulaza negativne stafilokoke dokazao u 18% uzoraka, Lafia (1998) koji je kaogulaza negativne stafilokoke izolovao iz 17,8% uzoraka mleka i Bergoniera (2003), koji je CNS izolovao u 78% slučajeva supkliničkih mastitisa ovaca.

Bakterija *Streptococcus sp.* izolovana je iz 19 (2,08%) uzoraka, a *Streptococcus agalactiae* samo iz jednog uzorka, što je manje od nalaza Bergoniera (2003), koji je *Streptococcus spp.* izolovao iz 6% slučajeva supkliničkih mastitisa ovaca, Lafia (1998), koji je *Streptococcus agalactiae* izolovao iz 6,8% uzoraka mleka supkliničkih mastitisa ovaca i Krzyscina (2007), koji je *Streptococcus spp.* izolovao iz 33,2% uzoraka mleka.

U našem istraživanju *Micrococcus sp.* je izolovana iz 186 (20,43%) uzoraka, što je više od nalaza Keislara (1992), koji je izolovao mikrokoke iz 5,5% uzoraka mleka ovaca sa supkliničkim mastitisima.

Iz mleka sa povećanim brojem SCC izolovane su *Proteus sp.* iz 121 (13,29%) uzorka mleka ovaca. *Proteus sp.* su izolovane iz mlečne žlezde ovaca koje se drže u lošim higijenskim uslovima gde ja veća aglomeracija životinja na manjem prostoru.

Izolati *Staphylococcus aureus* su bili osetljivi na gentamicin, trimetoprim + sulfametoksazol i neomicin, a na visoke doze penicilina umereno osetljivi. Schröder i sar. (2005) su utvrdili osetljivost svih izolata *S. aureus* na oksacilin, cefacetril i neomicin, pa ih preporučuju za terapiju kod mastitisa izazvanih ovim mikroorganizmom. Corti (2003) je kod 91% izolata *S. aureus* utvrdio osetljivost na penicilin G, ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, linkomicin, neomicin, gentamicin i kanamicin. Redukciju pojave stafilokoknih mastitisa (sa 41,3 na 9,9%) postigao je Linage (2008) kombinacijom preparata za zasušenje i to pentamat hidrojodida, benetamin penicilina i framacetin sulfata. Bergonier (2003) je utvrdio veću osetljivost *S. aureus* na tilmikosin *in vitro*, nego na druge upotrebljene antimikrobne lekove. Simko (1996) je utvrdio da je *S. aureus* osetljiv na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima, eritromicin, gentamicin, kanamicin, tetraciklin i linkomicin, a rezistentan na penicilin G i ampicilin, što je veoma slično rezultatima dobijenim u našem radu, a slabo osetljiv na cefalosporine, rifamicin i spiramicin.

Ispitivane kulture *Streptococcus agalactiae* pokazale su osetljivost na penicilinske preparate i kombinaciju trimetoprim + sulfametoksazol. Kod ove infekcije upotreba penicilinskih preparata uglavnom daje rezultate, tako da se kod kliničke forme mastitisa aplikuju visoke doze penicilina G ili polusintetskog penicilina (Gruneth, 1996). Linage (2008) je redukovao streptokokne mastitise (sa 5,8 na 1,8%) upotrebom preparata za zasušenje pentamat hidrojodida, benetamin penicilina i framacetin sulfata, što je u saglasnosti sa rezultatima naših ispitivanja.

Koagulaza negativne stafilokoke su osetljive na gentamicin i umereno osetljive na eritromicin, velike doze penicilina G, ampicilina, neomicina i na kombinaciju linkomicin + spektinomycin, što se razlikuje od nalaza Wintera (1999), koji je utvrdio da su koagulaza negativne stafilokoke osetljive na kloksacilin, spiramicin, cefoperazon i cefaleksin i na kombinaciju penicilin + novobiocin.

Izolati *E. coli* su bili osetljivi na gentamicin, ampicilin, kombinaciju trimetoprim + sulfametaksazol, enrofloksacin i neomicin, a hemolitična *E. coli* je bila osetljiva na gentamicin i kombinaciju trimetoprim + sulfametaksazol. Blagovremeno sprovedena adekvatna antibiotska terapija makrolidnim preparatima brzo dovodi do izlečenja (Gruneth, 1996). Smith (1985) preporučuje parenteralnu upotrebu antibiotika širokog spektra, i to gentamicina, tetraciklina, što je u saglasnosti sa rezultatima naših ispitivanja.

Mi smo ispitali i osetljivost izolovanih kultura *Bacillus sp.* koji su prema rezultatima antibiograma pokazale osetljivost na penicilin G, ampicilin, eritromicin i kombinaciju linkomicin + spektinomycin. Izolati *Pseudomonas spp.* su osetljivi na gentamicin, enrofloksacin i neomicin. Izolati *Proteus sp.* su osetljivi na gentamicin, enrofloksacin i neomicin. Izolati *Micrococcus spp.* su pokazali osetljivost na penicilin G, ampicilin i eritromicin. U nama dostupnoj literaturi nismo našli radove koji opisuju osetljivost navedenih mikroorganizama na antimikrobne lekove kod mastitisa ovaca. Razlog tome je što su *Bacillus spp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.* i *Micrococcus spp.* prisutni u mleku u veoma malom procentu kao izazivači supkliničkih mastitisa, te se njima ne pridaje veliki značaj.

Kod ponovne kontrole mleka nakon sprovedene terapije i isteka karence, odnosno, nakon deset dana od završetka terapije, antimikrobni lekovi koje smo koristili prema rezultatima antibiograma dali su zadovoljavajući učinak i ranije izolovane mikroorganizme više nismo mogli izolovati u mleku.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata ispitivanja najčešći izolovani uzročnici supkliničkih mastitisa ovaca su: *E. coli* u 189 (20,76%) slučajeva, *Micrococcus sp.* u 186 (20,43%) slučajeva, *Bacillus spp.* u 177 (19,45%) slučajeva, *Staphylococcus aureus* u 172 (18,9%) slučaja, *Proteus spp.* u 121 (13,29%) slučaju, *Streptococcus spp.* u 19 (2,08%) slučajeva, *Pseudomonas spp.* u 14 (1,53%) slučajeva, hemolitične *E. coli* u 6 (0,65%) slučaja i *Streptococcus agalactiae* u samo 1 (0,1%) slučaju.

Bakterija *Staphylococcus aureus* je pokazala osetljivost na gentamicin, kombinaciju trimetoprim + sulfanamidi i neomicin. Izolati nehemolitične *E. coli* su pokazali osetljivost na gentamicin, ampicilin, kombinaciju trimetoprim + sulfametaksazol, enrofloksacin i neomicin, a hemolitična *E. coli* je pokazala osetljivost na gentamicin i kombinaciju trimetoprim + sulfametaksazol. Izolati *Pseudomonas spp.* i *Proteus spp.* su bili osetljivi na gentamicin, enrofloksacin i neomicin, a izolovani sojevi *Bacillus spp.* su bili osetljivi na penicilin G, ampicilin, eritromicin i

linkomicin + spektinomycin. Izolati *Micrococcus* spp. su pokazali osetljivost na penicilin, ampicilin i eritromicin, a *Streptococcus agalactiae* na penicilinske preparate i kombinaciju trimetoprim + sulfametaksazol.

Literatura / References

1. Bergonier D, Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res 2003; 34: 689-716.
2. Burriel Ar. Isolation of coagulase negative staphylococci from the milk and environment of sheep. J Dairy Res 1998; 65(1): 139-42.
3. Corti S, Sacher D, Regli W, Stephan R. Current data on antibiotic resistance of the most important bovine mastitis pathogens in Switzerland. Schweiz Arch Tierheilkd 2003; 145(12): 571-5.
4. De Vlieger S, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, Leroy JL, Barkema HW, de Kruif A. Parturition teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. Vet Microbiol 2003; 92(3): 245-52.
5. González RN, Wilson DJ. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2003; 19(1): 199-221.
6. Gruneth E. Buiatrik. Verlag Schape, Hanover. 1996.
7. Keisler DH, Andrews ML, Moffatt RJ. Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. J Anim Sci 1992; 70: 1677-81.
8. Krzyscin P. Etiological factors of mastitis in Polish Merino ewes. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Polonia, 2007; XXV(1).
9. Lafi SQ, Al Majali AM, Rousan MD, Alawneh JM. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. Prev Vet Med 1998; 33(1-4): 171-81.
10. Linage B, Gonzalo C. Influence of an intramammary infusion at drying-off combined with penicillin, benzathine penicillin, and gramicidin sulfate on intramammary infections and somatic cell counts in dairy sheep. J Dairy Sci 2008; 91(9): 3459-66.
11. Marković B. Bolesti vimena domaćih životinja. Beograd, Naučna knjiga. 1992.
12. Mørk T, Steinar W, Tølleraud T, Kvile B. Clinical mastitis in ewes; bacteriological, epidemiology and clinical features. Acta Vet Scand 2007; 49(1): 23.
13. Pengov A. The role of Coagulase-Negative *Staphylococcus* sp. and Associated Somatic Cell Counts in the Ovine Mammary Gland. J Dairy Sci 2001; 84: 572-4.
14. Pyorala S. Antimicrobial treatment of mastitis-choice of the route of administration and efficacy. Proceedings of the British Mastitis Conference, Brockworth 2002: 20-9.
15. Schröder A, Hoedemaker M, Klein G. Resistance of mastitis pathogens in northern Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2005; 118(9-10): 393-8.
16. Simko S, Bartko P. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* mastitis in sheep, sheep milk and its products. Vet Med (Praha) 1996; 41(8): 241-4.
17. Smith KL, Todhunter DA. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J Dairy Sci 1985; 68: 1531-53.

18. Thorensberry C, Burton PJ, Yee YC, Watts JL, Yancey RJ. The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens; development of a disk diffusion test. J Dairy Sci 1997; 80: 413-21.
19. Winter P, Hoflechner A, Baumgartner W. Resistance patterns of ovine mastitis pathogens. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1999; 112(6-7): 212-22.

ENGLISH

SUBCLINICAL MASTITIS IN SHEEP – CAUSES AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS

Slobodanka Vakanjac, I. Todorović

The California mastitis test (CMT) was used to examine the milk of 6609 sheep, actually, from 13218 mammary complexes. A total of 986 milk samples were found to contain an increased number of somatic cells, and causes of mastitis were isolated from 910 (92.3%) of these samples. The most frequently isolated microorganisms were: *E. coli* isolated from 189 (20.76%) samples, *Micrococcus sp* from 186 (20.43%) samples, *Bacillus sp.* from 177 (19.45%), *Staphylococcus aureus* from 172 (18.9%) samples, and *Proteus sp.* from 121 (13.29%) samples of sheep milk. Coagulase-negative staphylococci (CNS) were isolated in a much smaller number, from 25 (2.74%) samples, *Streptococcus sp.* was isolated from 19 (2.08%) samples, *Pseudomonas sp.* from 14 (1.53%) samples, haemolytic *E. coli* was isolated from only 6 (0.65%) samples, and *Streptococcus agalactiae* from only one sample. Among the 25 isolates of coagulase-negative staphylococci, 16 (64%) isolates were identified as *Staphylococcus chromogenes*, and 9 (36%) isolates as *Staphylococcus simulans*. The sensitivity of the isolated causes of mastitis to antibiotics was examined using the disc diffusion method.

Key words: mastitis, sheep, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, antibiogram

РУССКИЙ

ПОДКЛИНИЧЕСКИЕ МАСТИТЫ ОВЕЦ - ВОЗБУДИТЕЛИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Слободанка Ваканяц, И. Тодорович

Калифорния мастит тест-ом (КМТ) испытано молоко 6609 овец, то есть из 13218 грудных комплексов. Из 986 образчиков молока у которых утверждено увеличенное число соматических клеток в молоке изолированы возбудители мастита из 910 (92,3%) образчиков. Наиболее частые изолированные микроорганизмы суть: *E. coli* изолированная из 189 (20,76%) образчиков, *Micrococcus sp.* из 186 (20,43%) образчиков, *Bacillus sp.* из 177 (19,45%), *Staphylococcus aureus* из 172 (18,9%) образчика и *Proteus sp.* из 121 (13,29%) образчика молока овец. Коагулаз отрицательной стафилококки (КОС), изолированные в много меньшем числе из 25

(2,74%) образчиков, *Streptococcus sp.* изолирован из 19 (2,08%) образчиков, *Pseudomonas sp.* из 14 (1,53%) образчиков, гемолитической *E. coli*, изолированные из всего 6 (0,65%) образчиков, а *Streptococcus agalactiae* из только одного образчика. Из 25 изолятов коагуляз отрицательных стафилококков как *Staphylococcus chromogenes* идентифицированы 16 (64%) изолятов, а как *Staphylococcus simulans* 9 (36%) изолятов. Чувствительность изолированных возбудителей мастита к антибиотикам, испытана диск диффузионным методом.

Ключевые слова: мастит, овцы, *Staphylococcus aureus*, коагуляз отрицательной стафилококки, антибиотикограмма

**KOMPARATIVNI PRIKAZ KVALITETA SVINJSKIH POLUTKI
PRIMENOM RAZLIČITIH METODA ISPITIVANJA*****COMPARATIVE PRESENTATION OF QUALITY OF PIG CARCASS
HALVES USING DIFFERENT EXAMINATION METHODS****Olga Kosovac, B. Živković, Č. Radović****

Istraživanje je urađeno na 135 svinjskih trupova/polutki različitih genotipova, oba pola u nekoliko klanica u Vojvodini. Stratifikacija polutki prema telesnoj masi izvršena je na osnovu koeficijenta linearne regresije osobina na masu ohlađenih polutki. Primenjena je analiza "General Regression Models"/statistika 8. Procenat mišićnog tkiva procenjen je na tri načina: Simulacijom instrumentalne metode FOM i primenom metode disekcije: EU1, (Commission Regulation, 3127/94) i EU2 (Commission Regulation, 1197/2006). Dobijeni rezultati su pokazali da je relativni udeo mišićnog tkiva u polutkama svinja određen prema prethodnom pravilniku EU1 signifikantno ($p < 0,05$) niži (49,90%) od utvrđenog udela mišićnog tkiva prema matematičkom modelu FOM (53,71%) i prema važećem pravilniku EU2 (54,03 %). Na ohlađenim polutkama zaklanih svinja udeo mesa buta čini 16,05%, udeo mišićnog tkiva plećke 7,11%, LSD 8,49% i TRD 4,95. Distribucijom svinjskih trupova u tržišne klase prema SEUROP sistemu primenom FOM i EU2 metode sve polutke svrstane u srednje trgovačke klase (E i U), dok je EU1 formula klasifikovala samo 36,30% svinjskih polutki u istu trgovačku klasu, a 63,70% u nižu trgovačku klasu (R). Nijedna formula nije klasifikovala nijedan trup u tržišne klase mesa sa najvišim (S) i najnižim udelom mesa (O i P). Na osnovu toga zaključujemo da je ispitivani uzorak srednjeg kvaliteta, tj. polutke spadaju u srednje kvalitetne trgovačke klase (E, U i R). Na kraju može se zaključiti da zbog ustanovljenih razlika dobijenog procenta mesa primenom predhodne (EU1) i važeće (EU2) jednačine neophodna su dalja istraživanja na ovu temu.

Ključne reči: svinja, kvalitet trupa/polutki, metode procene

* Rad primljen za štampu 19. 02. 2010. godine

** Dr Olga Kosovac, naučni saradnik, dr Branislav Živković, naučni savetnik, mr Čedomir Radović, Institut za stočarstvo, Zemun, R Srbija

Uvod / Introduction

Kada govorimo o kvalitetu svinjskih trupova/polutki sa sigurnošću možemo reći da je to u svinjarstvu uvek prisutna tema, to je tema koja zavređuje pažnju kako nauke tako i prakse. Kvalitet svinjskih trupova/polutki očituje se visokim učešćem mišićnog tkiva, a naročito u važnijim delovima polutke kao što su but, plečka, leđno-slabinski deo (LSD) i trbušno rebarni deo (TRD). Prvi standardi za ocenu kvaliteta svinjskih trupova/polutki definisani su još krajem šezdesetih godina prošlog veka i do kraja devedesetih godina u većini zemalja EU procena mesnatosti se zasnivala na merenju debljine leđne slanine. Osnova za ovakvu metodu procene je visoka korelacija ($r=0,75$) između debljine leđne slanine i procenta mesa u trupovima/polutkama svinja. Poslednjih godina značajan deo naučnih istraživanja je usmeren ka iznalaženju optimalnih rešenja za brzom i pouzdanom procenom kvaliteta svinjskih trupova/polutki. U tu svrhu je Savet EU 1992. godine preporučio posebnu metodu disekcije (parcijalna disekcija), koja je uvedena 1994. godine (Uredba Komisije br. 3127/94, 1994), a koju su detaljno opisali Walstra i Merkus (1996). U legislativi EU u primeni je najnovija metoda utvrđivanja mesnatosti svinjskih trupova/polutki – EU referentna metoda disekcije (Uredba Komisije 1197/2006). Ova metoda se zasniva na promeni faktora uključenih u jednačinu, utvrđenu na disekciji četiri osnovna dela (but, plečka, LSD i TRD).

Rezultati istraživanja mnogih autora su pokazali da postoje razlike između populacija svinja u odnosu na sastav polutki i distribuciju pojedinih tkiva (Luković i sar., 2000; Timanović, 2003; Bahelka i sar., 2005; Kušec i sar., 2006; Kosovac i sar., 2007; Ukmar i sar., 2008; Đurkin i sar., 2008). Sasvim je sigurno da je neosporan i uticaj primene različitih metoda procene kvaliteta trupova/polutki svinja.

Imajući u vidu prethodno navedeno, cilj ovog rada je bio da se utvrdi mesnatost svinjskih trupova/polutki u delu populacije svinja u Srbiji, koristeći najnoviju metodologiju propisanu Uredbom Komisije iz 2006. godine (1197/2006). Dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima utvrđenim po metodologiji iz 1994. godine (Uredba Komisije 3127/1994) i na liniji klanja po parametrima i kriterijumima na osnovu predloga pravilnika o kvalitetu zaklanih svinja (Petrović, 2009, <http://www.minpolj.gov.rs/izveštaj.pdf>)

Materijal i metode rada / Material and methods

Istraživanje je sprovedeno na 135 svinjskih trupova/polutki različitih genotipova, oba pola u nekoliko klanica u Vojvodini. Stratifikacija polutki prema telesnoj masi izvršena je na osnovu koeficijenta linearne regresije osobina na masu ohlađenih polutki. Primenjena je analiza "General Regression Models"/ statistika 8, a statistička značajnost razlika između prosečnih vrednosti ispitana je Tukey-testom.

Merenje mase toplih polutki izvršeno je 45 minuta nakon klanja (3220/84), a pre rasecanja na toplim desnim polutkama procenjen je procenat mišićnog tkiva. Korišćeno je više metoda procene:

1. Simulacijom instrumentalne metode FOM, utvrđivan je sadržaj mesa u polutkama i klasa polutki (SEUROP), po formuli koju su definisali Petrović i sar. (2009), merenjem debljine masnog tkiva na dva mesta koja odgovaraju pozicijama uboda sonde FOM uređaja (LF i RF) i prečnika, odnosno dubine dugog lednog mišića (RM).

Za izračunavanje procenta mesa primenjena je sledeća formula, iz predloga pravilnika o kvalitetu zaklanih svinja (Petrović i sar. 2009):

$$Y = 55,6925 - 0,2402 \text{ LF} - 0,4575 \text{ RF} + 0,1578 \text{ RM}.$$

2. Metodom parcijalne disekcije, prema prethodnoj (EU1) Uredbi Komisije (Commission Regulation, 3127/94)

$$\text{EU1} = 1,3 \times 100 \times \frac{\text{masa podslabinskog mišića (filea)} + \text{mišićna masa 4 osnovna dela}}{\text{masa podslabinskog mišića (filea)} + \text{ukupna masa 12 delova polutke}}$$

3. Metodom parcijalne disekcije, prema važećoj (EU2) Uredbi Komisije (Commission Regulation, 1197/2006),

$$\text{EU2} = 0,89 \times 100 \times \frac{\text{masa podslabinskog mišića (filea)} + \text{mišićna masa 4 osnovna dela}}{\text{masa podslabinskog mišića (filea)} + \text{ukupna masa 4 osnovna dela}}$$

Jedan dan nakon klanja svinja leve polutke trupa su disekcirane prema referentnoj metodi EU (Commission Regulation (EC) No 3127/94), a koju su detaljno opisali Walstra i Merkus (1996). Po ovoj metodi polutka se po anatomski precizno definisanoj šemi raseca na 12 delova. Na osnovu količine mesa u četiri osnovna dela polutke – but, plečka, leđno-slabinski deo (LSD) i trbušno-rebarni deo (TRD), koji sadrže 75% ukupne muskulature i mase podslabinskog mišića (filea) izračunat je procenat mesa u polutkama.

Četiri osnovna dela trupa su rasčlanjena na osnovna tkiva: mišićno, koža sa potkožnim masnim tkivom (KoPo), intermuskularno masno tkivo (IMMT) i kosti.

Referentni procenat mesa je izračunat korišćenjem dve jednačine: prva (EU1) propisana od strane EC br. 3127/94.

Rezultati ispitivanja i diskusija / Results and Discussion

Prosečne vrednosti o zastupljenosti mišićnog tkiva u polutkama izračunati metodom FOM, prema prethodnom (EU1) i važećem Pravilniku (EU2)

prikazani su u tabeli 1. Dobijeni rezultati pokazuju da je relativni udeo mišićnog tkiva u polutkama svinja određen prema prethodnom Pravilniku (EU1) signifikantno ($p < 0,05$) niži (49,90%) od utvrđenog udela mišićnog tkiva prema matematičkom modelu FOM (53,71%) i u odnosu na izračunate vrednosti prema važećem Pravilniku EU2 (54,03%). Ovo ukazuje na to da se metodom procene mesnatosti svinjskih polutki prema prethodnom Pravilniku EU1 (Commission Regulation, 3127/94) potcenjuje udeo mesa u polutkama svinja, a što se vidi i iz grafikona 1.

Tabela 1. Mesnatost polutki izračunata metodom FOM, prema prethodnom (EU1) i važećem Pravilniku (EU2)

Table 1. Meat share in carcass halves calculated using FOM method, according to previous (EU1) and currently valid regulations (EU2)

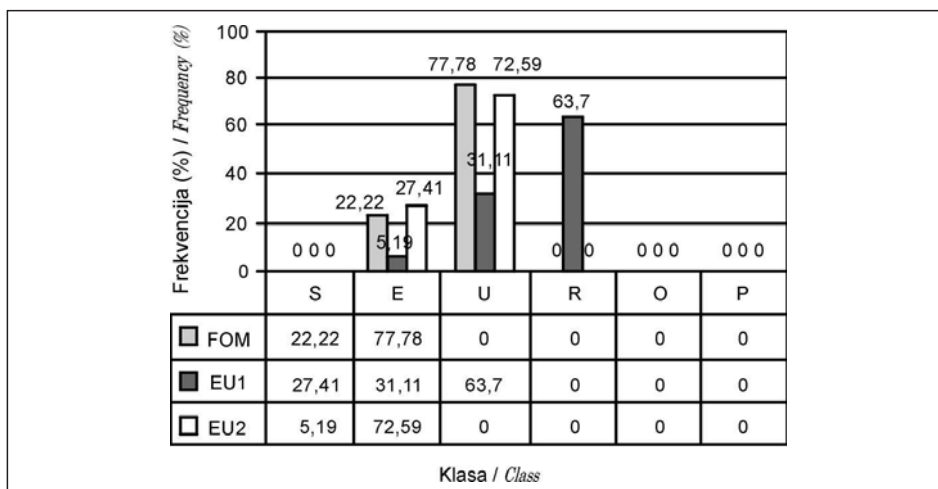
(N=135)

Statistički pokazatelj / Statistical indicator	FOM	EU1	EU2
Aritmetička sredina / Arithmetic mean	53,71 ^a	49,90 ^b	54,03 ^a
Minimum / Minimum	51,33	46,54	50,58
Maksimum / Maximum	56,30	57,92	59,68
Standardna devijacija / Standard deviation	1,36	2,44	2,12

a, b – signifikantnost na nivou 0,05 ($*p < 0,05$) / significance at 0.05 level ($*p < 0,05$)

Slična istraživanja su sprovedi Luković i sar. (2000); Timanović (2003); Bahelka i sar. (2005); Kušec i sar. (2006a); Kušec i sar. (2006b); Kušec i sar. (2007). U tim ispitivanjima su takođe ustanovljene značajne razlike između rezultata uporednih ispitivanja mesnatosti polutki FOM uređajem i disekcijom. Za razliku od navedenih autora Bahelka i sar. (2005) su u svojim ispitivanjima pri oceni kvaliteta polutki instrumentalnom metodom FOM i metodom parcijalne disekcije ustanovili da je vrednost sadržaja mesa ocenjena korišćenjem dve različite metode bila jednaka (55,54 %).

U grafikonu 1 prikazana je distribucija svinjskih polutki u trgovačke klase (SEUROP) prema procentu mesa procenjenih matematičkom metodom FOM, prema prethodnom Pravilniku, EU1 (Commission Regulation, 3127/94) i prema važećem Pravilniku, EU2 (Commission Regulation, 1197/2006) EU. Prema prethodnom Pravilniku (EU1) 63,7 % polutki je klasifikovano u nižu trgovačku klasu, R, za razliku od ostalih primenjenih metoda (FOM i EU2) gde su sve polutke klasifikovane u više trgovačke klase, E i U. Značajno je napomenuti da nijedna od primenjenih formula nije klasifikovala polutke u tržišne klase sa najvišim, S, i najnižim udelom mesa, O i P. Na osnovu toga zaključujemo da je ispitivani uzorak srednjeg kvaliteta, tj. polutke spadaju u srednje trgovačke klase (E, U i R).



Grafikon 1. Distribucija svinjskih polutki u trgovačke klase (SEUROP) prema procentu mesa (N = 135)

Graph 1. Ranking of pig carcass halves into market class (SEUROP) according to meat percentage (N = 135)

Dobijeni rezultati o ispitivanjima udela pojedinih tkiva u delovima polutke i u celoj polutci prikazani su u tabeli 2. Iz podataka se vidi da na ohlađenim polutkama zaklanih svinja udeo mesa buta čini 16,05%, udeo mišićnog tkiva plečke 7,11%, LSD 8,49% i TRD 4,95%. Najveći udeo KoPo u polutci potiče od buta 4,42%, a najmanji udeo iz plečke (2,63%). LSD i TRD imaju približno iste vrednosti (3,41 i 3,16%) udela KoPo u polutci. Najveći udeo kostiju utvrđen je u LSD (15,60%) i učestvuje sa 2,35% u polutci, a najmanji u TRD sa 6,54%, tj. sa učešćem u polutci od 0,60%. U udelu IMMT u polutci najviše doprinosi TRD sa 1,40%, zatim sledi but sa 1,33%, a sa približnim vrednostima od 0,87% i 0,89 % učestvuje plečka i LSD.

Slična istraživanja sprovedli su Kosovac i sar. (2008) ispitujući kvalitet trupa i mesa svinja različitih genotipova. U zavisnosti od ispitivane grupe svinja udeo mesa u butu se kretao u intervalu od 73,12 do 76,46%, u plečki od 61,38 do 67,59%, LSD od 59,77 do 63,66%, a u TRD od 55,68 do 59,70%. Ove vrednosti su znatno veće od onih koje su dobijene u našim ispitivanjima.

Korelacije između % mesa procenjenog matematičkim modelom FOM i korišćenjem dve formule koje su propisane prethodnim i važećim Pravilnikom EU prikazani su u tabeli 3 i kreću se u granicama od 0,38 do 0,91. Ustanovljena je visoka pozitivna korelacija (0,91) između procenta mesa korišćenjem formule propisane po prethodnom i važećem Pravilniku EU (EU1 i EU2).

Tabela 2. Udeo pojedinih tkiva u osnovnim delovima polutke svinja /
Table 2. Share of certain tissues in elementary parts of pig half-carasses

Deo polutke / Part of carcass half	Udeo u delu polutke / Share in carcass part (%)	Udeo u celoj polutki / Share in whole carcass half (%)
Mišićno tkivo / Muscle tissue		
But / Ham	67,67	16,05
Plečka / Shoulder	59,37	7,11
Leđno-slabinski deo / Back and loin	56,07	8,49
Trbušno-rebarni deo / Belly and ribs	48,65	4,95
Koža i potkožno masno tkivo (KoPo) / Skin and subcutaneous fatty tissue (KoPo)		
But / Ham	18,67	4,42
Plečka / Shoulder	22,04	2,63
Leđno-slabinski deo / Back and loin	22,47	3,41
Trbušno-rebarni deo / Belly and ribs	31,10	3,16
Kosti / Bones		
But / Ham	8,07	1,91
Plečka / Shoulder	11,36	1,35
Leđno-slabinski deo / Back and loin	15,60	2,35
Trbušno-rebarni deo / Belly and ribs	6,54	0,66
Intermuskularno masno tkivo (IMMT) / Intermuscular fatty tissue (IMMT)		
But / Ham	5,60	1,33
Plečka / Shoulder	7,22	0,87
Leđno-slabinski deo / Back and loin	5,86	0,89
Trbušno-rebarni deo / Belly and ribs	13,72	1,40

Tabela 3. Koeficijenti korelacije (r) između procenta mesa utvrđenog različitim metodama u ispitivanim polutkama svinja /

Table 3. Correlation coefficient (r) between meat percentage established using different methods in examined pig half-carasses

(N=135)

FOM		EU1
EU1	EU2	EU2
0,38	0,38	0,91

Zaključak / Conclusion

Na osnovu istraživanja i upoređivanja kvaliteta svinjskih trupova na liniji klanja, prema prethodnom (EU1) i važećem Pravilniku EU (EU2) može se zaključiti sledeće:

- Relativni udeo mišićnog tkiva u polutkama svinja određen prema prethodnom Pravilniku (EU1) signifikantno ($p < 0,05$) je niži (49,90%) od utvrđenog udela mišićnog tkiva ustanovljenog prema matematičkom modelu FOM (53,71%) i prema važećem Pravilniku (EU2), a koji je iznosio 54,03%.

- Ispitivani uzorak je srednjeg kvaliteta jer su polutke svrstane u srednje trgovačke klase (E, U i R).

- Na ohlađenim polutkama svinja najveći udeo mesa potiče iz buta 16,5%, zatim sledi LSD sa 8,49%, plečka sa 7,11%, a najniži udeo mesa nalazi se u TRD 4,95%.

- Ustanovljena je visoka, pozitivna skoro potpuna korelacija (0,91) između procenta mesa korišćenjem formule propisane po prethodnom (Commission Regulation, 3127/94) i važećem (Commission Regulation, 1197/2006) Pravilniku EU (EU1 i EU2).

Literatura / References

1. Bahelka I, Demo P, Peškovičová D. Pig carcass classification in Slovakia – New formulas for two point method and measuring instruments. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2005; 21(5-6): 181-5.
2. Commission regulation (EC) No 3127/94 of 20 December 1994 amending regulation (EC) No 2967/85 laying down detailed rules for the application of the Communities 1994; No L 330, 21/12/1994, 43-4.
3. Commission regulation (EC) No 1197/2006 of 7 August 2006 amending regulation (EC) No 1197/2006 laying down detailed rules for the application of the Communities 2006; No L 217, 8/8/2006, 0006-0007.
4. Đurkin I, Kušec G, Petričević A, Kralik G, Malta Z, Margeta V. Croatian Pigs Assessed By Previous and Current EU Legislation. *Proceedings of 54th International Congress on Meat Science and Technology*, 10-15 August 2008, Cape Town, South Africa.
5. Kosovac O, Živković B, Radović Č. Prinos mesa u trupovima svinja različitih genotipova. *Zbornik radova 42. Hrvatskog i 2. Međunarodnog simpozijuma agronoma*, 13.-16. Veljače 2007, Opatija, Hrvatska 548-51.
6. Kosovac O, Stanišić N, Živković B, Radović Č, Pejčić S. Kvalitet trupa i mesa svinja različitih genotipova. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2008; 24(1-2): 77-86.
7. Kušec G, Đurkin I, Petričević A, Kralik G, Maltar Z. Utjecaj spola na distribuciju tkiva u svinjskim polovicama. *Krmiva* 2006a; 48(3): 131-42.
8. Kušec G, Kralik G, Petričević A, Đurkin I, Margeta V, Maltar Z. Comparison of different methods for lean percentage evaluation in pig carcasses. *Acta Agraria Kaposvariensis* 2006b; 10(2): 57-62.

9. Kušec G, Đurkin I, Petričević A, Kralik G, Maltar Z, Margeta V, Hanžek D. Equations for lean share estimation in swine carcasses in Croatia. *Agriculture* 2007; 13(1): 70-3.
10. Luković Z, Uremović M, Hrabak V, Uremović Z, Ambrušec Lj. Difference in Predicting Swine Meatiness as a Result of Different Measurements. *Agriculturae Con-spectus Scientificus* 2000; 65(4): 213-7.
11. Pedersen OK. Present conditions and perspectives of pig carcass evaluation and comercial grading. International meeting on pig carcass and meat quality 1988; Reggio Emilia, Italia.
12. Petrović LJ. Definisanje parametara i kriterijuma za ocenu kvaliteta polutki svinja u cilju izrade predloga pravilnika o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa 2009; <http://www.minpolj.gov.rs/download/izveštaj.pdf>
13. Timanović S. Efekat različitih modela selekcije i šema ukrštanja na prinose i kvalitet mesa svinja. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad 1999.
14. Ukmar R, Djurkin I, Maltar Z, Kralik G, Petričević A, Kušec G. Mesnatost i sastav kla-onički obradjenih trupova svinja u Hrvatskoj. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* 2008; X(6): 452-8.
15. Walstra P, Merkus GSM. Procedure for assessment of the lean meat percentage as a consequence of the new EU reference dissection method in pig carcass clas-sification. Research Institute for Animal Science and Health Report 1996; ID-DLO 96.014, 1-22, Research Branch, Zeist, The Netherlands.

ENGLISH

COMPARATIVE PRESENTATION OF QUALITY OF PIG CARCASS HALVES USING DIFFERENT EXAMINATION METHODS

Olga Kosovac, B. Živković, Č. Radović

Investigations were performed on 135 pig half-carcasses of different geno-types, of both sexes, at several abattoirs in Vojvodina. The determination of the carcass halves according to body mass was performed on the grounds of the linear regression co-efficient of characteristics per mass of chilled halves. The General Regression Models analysis, statistics 8, was applied. The percentage of muscle tissue was assessed in three ways: Simulation of the FOM instrumental method and using the dissection method: EU1 (*Commission Regulation, 3127/94*) and EU2 (*Commission Regulation, 1197/2006*). The obtained results demonstrated that the relative share of muscle tissue in pig carcass halves determined according to the EU1 regulation was significantly (<0.05) lower (49.90%) than the established share of muscle tissue according to the FOM mathematical model (53.71%) and according to the valid EU2 regulation (54.03 %). In the chilled pig carcass halves, ham meat accounted for 16.05%, muscle tissue of the shoulder for 7.11%, LSD 8.49% and TRD 4.95. According to the distribution of carcass halves into market classes according to the SEUROP system using the FOM and EU2 methods, all carcass halves were ranked medium market class (E and U), while the EU1 formula classified only 36.30% of the carcass halves into the same class, and 63.70% into a lower market class (R). None of the formulas classified any carcass half as having the highest "S" or the lowest percent-age of meat "O" and "P". On these grounds, we conclude that the examined samples are of

medium quality, in fact, that the carcass halves belong to the medium quality market class (E, U and R). In closing, it can be concluded that further investigations on this subject are necessary because of the established differences in the meat percentage obtained by applying the previous (EU1) and the currently valid (EU2) formula.

Key words: pig, half-carcass quality, assessment methods

РУССКИЙ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПОКАЗ КАЧЕСТВА СВИНЫХ ТУШ ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИСПЫТАНИЯ

Ольга Косовац, Б. Живкович, Ч. Радович

Исследование сделано на 135 свинных туловищ/туш различных генотипов, оба пола в несколько скотобойнях в Воеводине. Стратификация туш по массе тела совершена на основе коэффициента линейной регрессии свойств на массу охлаждённых туш. Применён анализ "General Regression Models" / статистика 8. Процент мышечной ткани оценен на три способа: Симуляцией инструментального метода (СИМ) FOM и применением метода секции: EU1 (Commission Regulation, 1197/2006). Полученные результаты показали, что релятивная доля мышечной ткани в тушах свиней определена по предыдущей инструкции EU1 сигнификантно ($p < 0,05$) ниже (49,90%) утверждённой доли мышечной ткани по математической модели FOM (53,71%) и по действующей инструкции EU2 (54,03%). На охлаждённых тушах убитых свиней доля мяса бедра составляет 16,05%, доля мышечной ткани лопатки 7,11% LSD 8,49% и TRD 4,95. Дистрибуцией свинных туловищ в рыночные классы по SEUROP системе применением FOM и EU2 метода все туши, распределенные в средние торговые классы (E и U), пока EU1 формула классифицировала только 36,30% свинных туш в такой же торговый класс, а 63,70% в более низкий торговый класс (R). Ни одна формула не классифицировала ни одно туловище в рыночные классы мяса с наивысшим "S" и наинизшей доли мяса "O" и "P". На основе этого мы сделаем вывод, что испытываемый образчик среднего качества, т.е. туши относятся к средним качественным торговым классам (E, U и R). На конце можно сделать вывод, что из-за установленных разниц полученного процента мяса применением предыдущей (EU1) и действующей (EU2) уравнения необходимы дальнейшие исследования на эту тему.

Ключевые слова: свинья, качество туловища/туши, методы оценки

**FARMAKOLOŠKI RECEPTORI NEMATODA KAO CILJNA
MESTA DELOVANJA ANTIPARAZITSKIH LEKOVA***
*PHARMACOLOGICAL RECEPTORS OF NEMATODA AS TARGET
POINTS FOR ACTION OF ANTIPARASITIC DRUGS*

S. M. Trailović, S. R. Ivanović, Jelena Nedeljković Trailović,
A. P. Robertson**

Holinergički receptori parazitskih nematoda jedno su od najvažnijih mogućih mesta delovanja antiparazitskih lekova. U ovom radu prikazani su neki od rezultata elektrofizioloških i farmakoloških ispitivanja nikotinskog i muskarinskog receptora nematoda, kao i literaturni podaci o novoj klasi antihelmintika koji deluju upravo na holinergičke receptore. Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) se nalazi na somatskim mišićnim ćelijama nematoda i odgovoran je za koordinaciju kretanja parazita. Holinomimetički antihelmintici deluju na ovaj receptor kao i acetilholin, endogeni neurotransmiter, ali nisu osetljivi na enzim acetilholin-esterazu koja razlaže acetilholin. Za razliku od nikotinskog receptora vertebrata, čija je struktura dobro ispitana, stohiometrija nikotinskog receptora nematoda nije u potpunosti poznata. Međutim, u skorije vreme na osnovu dosadašnjih saznanja konstruisan je model potencijalnog sastava jedne vrste nikotinskog receptora nematoda, kao mesta delovanja antihelmintika. Na osnovu ranijih istraživanja postoji pretpostavka da klasični muskarinski receptor postoji i kod nematoda, tako da i on može biti novo farmakološko ciljno mesto za razvoj antinematodnih lekova. Najnovija klasa sintetisanih antihelmintika, nazvana aminoacetonitrili (AAD), deluje preko nikotinskog receptora. Monepantel je prvi lek iz grupe AAD kao najznačajniji kandidat za registraciju u veterinarskoj medicini. Iako se u veterinarskoj kliničkoj praksi već duži niz godina primenjuje nekoliko grupa holinomimetičkih antihelmintika (imidazotiazoli, tetrahidropirimidini, organofosfatni antihelmintici), očigledno je da holinergički receptori nematoda i dalje pred-

* Rad primljen za štampu 29. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Saša M. Trailović, vanredni profesor, mr sci. med. vet. Saša R. Ivanović, asistent, dr sci. med. vet. Jelena Nedeljković Trailović, docent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. vet. Alan P. Robertson, docent, Iowa State University, College of Veterinary Medicine

stavljaju atraktivno mesto u ispitivanju i razvoju novih antinematodnih lekova.

Ključne reči: antiparazitski lekovi, nikotinski receptor, muskarinski receptor, aminoacetonitrili (AAD)

Uvod / Introduction

Infekcije domaćih životinja parazitskim nematodama dovode do smanjene produktivnosti, poremećaja opšteg zdravstvenog stanja, a ponekad i do uginuća. Antinematodni lekovi podeljeni su u nekoliko grupa: benzimidazoli, imidazoltiazoli, avermektini i milbemicini, tetrahidropirimidini i dr. Benzimidazoli deluju nematocidno tako što inhibišu transport i preuzimanje glukoze ili inhibišu fumarat-reduktazu i vezuju se za β -tubulin u mikrotubulima; imidazoltiazoli i tetrahidropirimidini su agonisti nikotinskog receptora, a piperazin, avermektini i milbemicini agonisti GABA receptora nematoda (Adams, 2001).

Mi smo posebno zainteresovani za holinergičke receptore parazitskih nematoda jer su jedno od najznačajnijih mogućih mesta delovanja antiparazitskih lekova. U ovom radu prikazujemo neke od rezultata sopstvenih elektrofizioloških i farmakoloških ispitivanja nikotinskog i muskarinskog receptora nematoda, ali i publikovane literaturne podatke o potpuno novoj klasi antihelmintika koja deluje upravo na holinergičke receptore.

Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) nematoda kao mesto delovanja antihelmintika / *Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) of nematodes as site of action of anthelmintics*

U grupu klasičnih holinomimetičkih antihelmintika, za koje je dokazano da deluju kao ligandi nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda, spadaju imidazotiazoli (levamizol i tetramizol) i tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel), dok danas gotovo potpuno napušteni organofosfatni antihelmintici efekat ostvaruju povećavajući koncentraciju endogenog acetilholina na receptorima. Nikotinski acetilholinski receptor se nalazi na somatskim mišićnim ćelijama nematoda i odgovoran je za koordinaciju kretanja parazita. Holinomimetički antihelmintici deluju kao i acetilholin, endogeni neurotransmiter, ali nisu osetljivi na enzim acetilholin-esterazu koja razlaže acetilholin. Generalizovano dejstvo lekova na somatske mišićne parazita izaziva spastičnu paralizu. Na celularnom nivou ova grupa antihelmintika dovodi do povećanja ulazne provodljivosti i posledične depolarizacije ćelije, nastale otvaranjem neselektivnih katjonskih kanala. Na nivou pojedinačnih jonskih kanala, levamizol kao tipični predstavnik ove grupe lekova otvara neselektivni katjonski kanal čija je provodljivost 18 do 50 pS, a vreme otvorenosti 1 do 5 ms. Efekt levamizola se može potpuno blokirati meka-

milaminom ili paraherkvamidom, za koje je dokazano da su specifični blokatori nAChR nematoda (Adams, 2001; Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b).

Svi nAChR su sastavljeni od 5 proteinskih subjedinica. Najznačajniji podaci o ovom receptoru su dobijeni ispitivanjima na *Torpedo californica* (električna raža), a najverovatnije i nikotinski receptor nematoda ima vrlo sličnu strukturu. Sadrži dve (ili više) α -subjedinica i tri (ili manje) $\text{ne-}\alpha$ subjedinica. One su postavljene u krug oko centralne pore, gradeći transmembranski jonski kanal. Jonsku poru čine drugi transmembranski regioni svake subjedinice (TM2). Negativno naelektrisane amino kiseline (glutamat, aspartat) u ovom TM2 regionu regulišu provodljivost kanala, njegovu katjonsku selektivnost i nivo propustljivosti za kalcijum (Robertson i sar., 2007a).

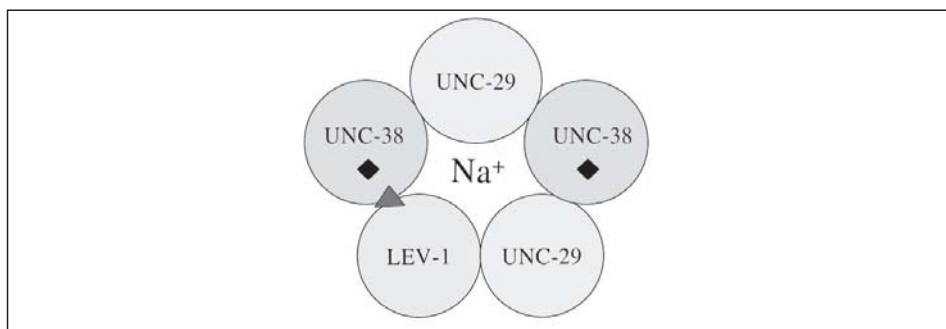
Kod vertebrata nAChR može biti podeljen u dve grupe: nikotinski receptor u skeletnim mišićima, koji je sastavljen iz 2 α -subjedinice i po jedne β , γ i δ -subjedinice kod adultnih organizama. Na α -subjedinicama se nalazi po jedno mesto za vezivanje liganda (dva mesta na receptoru); neuronski nAChR koji je druga vrsta nikotinskog receptora vertebrata, poseduje nešto složeniju stohiometriju. Dve ili čak više α -subjedinica sa β -subjedinicama grade pentamerni kanal. Takođe, moguće je da kanal bude pentamerni monomer, koga čine samo α -subjedinice. Kod vertebrata postoji najmanje 12 α -subjedinica i 3 β -subjedinice, ali samo manji broj njih gradi funkcionalne receptore. Samo subjedinice od $\alpha 7$ do $\alpha 12$ čine homomerni kanal (bez kombinacije sa β -subjedinicama). Različiti homomerni i heteromerni receptori imaju različite farmakološke karakteristike (Robertson i sar., 2007b).

Za razliku od ovih podataka kod nematoda nije potpuno poznata stohiometrija nikotinskog receptora. Poznato je da veći broj gena enkodira sintezu različitih subjedinica nikotinskog receptora nematoda i nadmašuje po raznolikosti subjedinice vertebrata. Ovo ukazuje na veliki diverzitet tipova nikotinskih receptora nematoda. Farmakološki gledano, nikotinski receptor nematoda je sličniji neuronskom receptoru vertebrata, jer je recimo neosetljiv na blokadu α -bungarotoksinom. Za razliku od vertebrata, kod adultnih nematoda je dokazano više tipova nAChR na mišićnim ćelijama (Robertson i sar., 2007a).

Kod *Caenorhabditis elegans*, slobodno živeće nematode, mogu se diferencirati dve struje koje nastaju kada acetilholin otvori kanal: prva, nazvana nikotin-osetljiva struja, koja se može blokirati dihidro- β -eritroidinom, a preferira nikotin kao agonist; i druga, nazvana levamizol-osetljiva struja, koja je neosetljiva na dihidro- β -eritroidin i preferira levamizol kao agonist. Kod velike nematode svi-nja *Ascaris suum*, dokazana su tri tipa nAChR na mišićnoj membrani: L-tip (preferira levamizol kao agonistu), N-tip (preferira nikotin kao agonistu) i B-tip (preferira befinijum kao agonistu). Levamizol aktivira L-tip kanala, ali u manjoj meri otvara i N i B-tip kanala. Befinijum pre svega otvara B-tip kanala, ali i L-tip, dok na N-tip ne deluje. Očigledno da je kod parazitskih nematoda farmakološka diferenciranost

različitih tipova nikotinskog receptora manje izražene nego kod *C. elegans* (Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b).

Na osnovu dosadašnjih saznanja konstruisan je model potencijalnog sastava jedne vrste nikotinskog receptora nematoda, prikazan na slici 1. Receptor se sastoji iz 5 proteinskih subjedinica koje okružuju centralnu jonsku poru. UNC-38 je subjedinica homologna α -subjedinici vertebrata, UNC-29 i LEV-1 su subjedinice homologne β -subjedinici vertebrata. Interfejs između α i ne- α subjedinice gradi mesto vezivanja nikotinskih agonista (trougao). Analogno α -subjedinici vertebrata svaka UNC-38 može da sadrži mesto vezivanja acetilholina (četvorougao) (Koëhle, 2001).

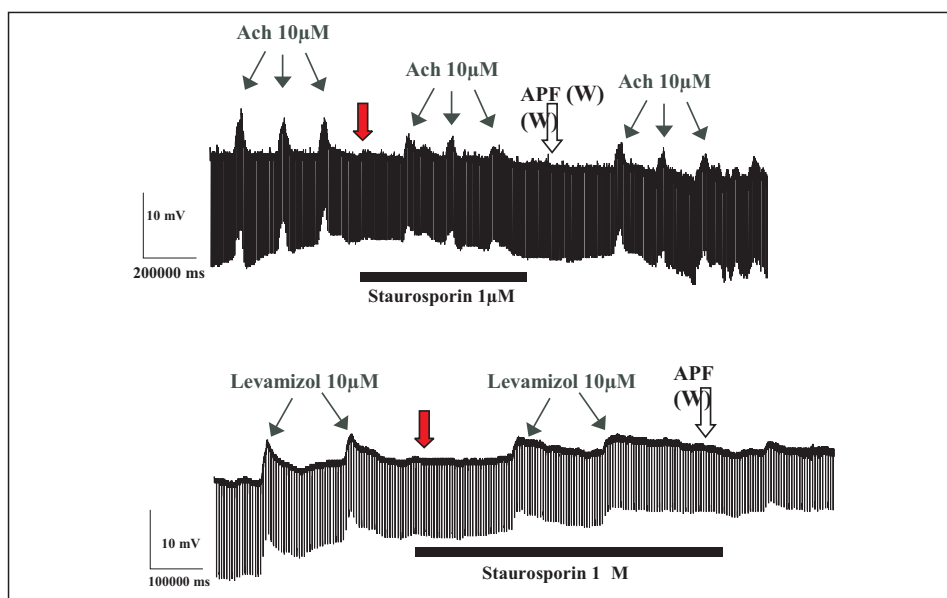


Slika 1. Model katjinskog kanala nematoda koga otvara acetilholin i levamizol
Figure 1. Model of nematode cation ion-channel, which opens both acetylcholine and levamisole

Jedno od osnovnih pitanja vezanih za sam mehanizam dejstva holinergičkih agonista je njegova selektivna toksičnost. Iz gore navedenog proizilazi da je levamizol puni agonist nAChR na mišićima nematoda. Osnovno pitanje je kako levamizol deluje na isti receptor u mišićima sisara. Elektrofiziološkim metodama ispitivanja (merenjima provodljivosti pojedinačnog kanala) ustanovljeno je da ovaj antiparazitik aktivira nikotinski kanal sisara. Otvaranje pojedinačnog kanala traje kraće u odnosu na efekat klasičnog neurotransmitera acetilholina i ne dolazi do serije otvaranja u obliku klastera, kada se primene više koncentracije leka. Maksimalna struja koja nastaje posle otvaranja kanala levamizolom je svega 3% struje koju izazove acetilholin. Može se zaključiti da levamizol deluje kao slabi agonist nAChR sisara. Takođe, levamizol izaziva blokadu otvorenog kanala AChR. Afinitet kojim izaziva blokadu (190 μ M, -70 mV) je sličan kao i kod nematodnog receptora što ukazuje na to da se ovde radi o različitoj osetljivosti receptora nematoda i sisara prema levamizolu, a ne o razlikama u kinetici otvaranja kanala. Poznato je da se α -subjedinica nAChR nematoda i sisara razlikuje. Kada se aminokiselina α Gly-153 zameni homolognom glutaminskom kiselinom nematoda, u nAChR sisara dolazi do signifikantnog povećanja osetljivosti prema levamizolu. Ovo je pravo objašnjenje selektivnog dejstva levamizola na nikotinski receptor pa-

razita bez značajnijih efekata na nikotinske receptore domaćina (Rayes i sar., 2004).

Ispitivanja sa proteinskim kinazama, odnosno njihovim inhibitorima, donose nove podatke da i postreceptorska modifikacija može promeniti odgovor na lek i kao takva učestvovati u smanjenoj reakciji rezistentnih parazita na antiparazitik. U našim istraživanjima koristili smo selektivne antagoniste enzima kinaza, da bismo ispitali značaj kinaza i procesa fosforilizacije u modulaciji funkcije nikotinskog receptora. Naša ispitivanja pokazuju da odgovor mišićne ćelije *Ascaris suum* nije uvek isti već da varira upravo zavisno od stanja fosforilizacije nAChR. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da rezistencija na levamizol ne zahteva ultimativnu promenu aminokiselina na mestu vezivanja leka za receptor, već da može uključivati regulaciju aktivnosti receptora kroz promene stanja njegove fosforilizacije (slika 2) (Trailović i sar., 2002).



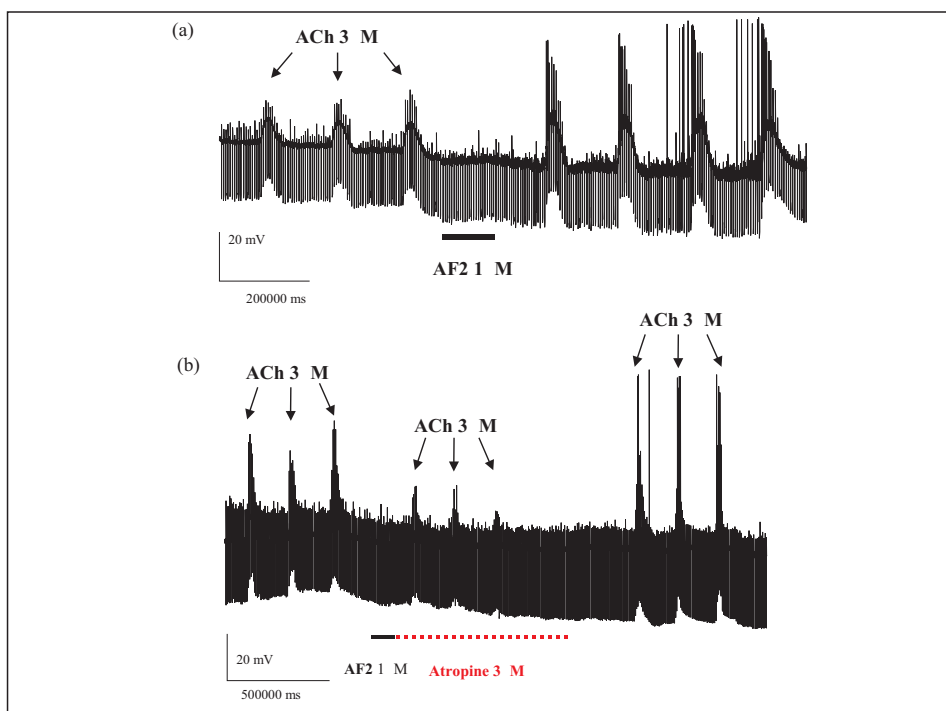
Slika 2. Dejstvo staurosporina, neselektivnog inhibitora proteinskih kinaza (protein kinaze A, C, G i CaM kinaze) na depolarizaciju mišićne ćelije *A. suum* izazvane acetilholinom ili levamizolom

Figure 2. Effects of staurosporine (broad-spectrum kinase inhibitor with activities against PKA, PKG, PKC, myosin light chain kinase (MLCK), CaM kinase and tyrosine kinase) on the depolarization of the *Ascaris suum* muscle cell caused by acetylcholine or levamisole

Neurotransmisija kod nematoda / *Neurotransmission in nematodes*

Drugi deo naših ispitivanja odnosi se na značaj neuropeptida nematoda u neurotransmisiji. Neuropeptid AF2 je prvi put otkriven kod *Ascaris suum*, ali

kasnije i kod nekoliko drugih vrsta nematoda: *C. elegans*, *Panagrellus redivivus* i *Haemonchus contortus*. AF2 izaziva dugotrajno potenciranje dejstva acetilholina, ali ne i levamizola. Potenciranje efekta acetilholina pokazuje da nikotinski receptor nematoda poseduje značajan nivo plastičnosti. To navodi na zaključak da je moguće farmakološkim putem prevenirati razvoj rezistencije na holinergičke antihelmintike (slika 3) (Trailović i sar., 2005).



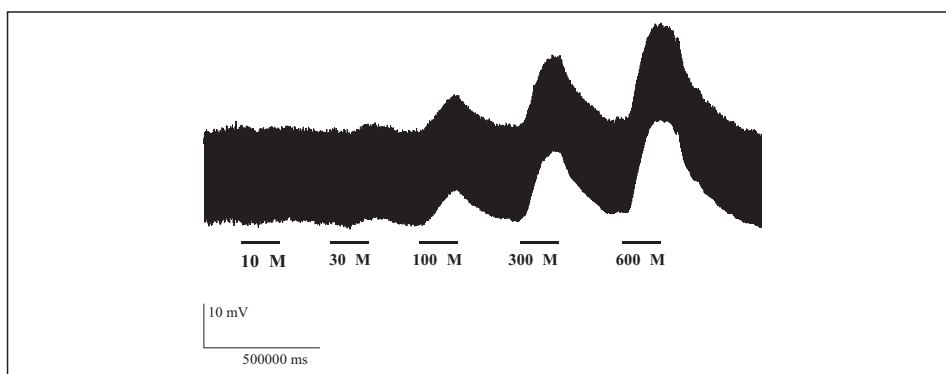
Slika 3. Kratkotrajna aplikacija neuropeotida AF2 dovodi do pojačanja depolarizacionog efekta acetilholina na mišićnoj ćeliji *A. suum* (a); Ovakav efekt AF2 je osetljiv na atropin (b)

Figure 3. Brief application of AF2 produces lasting potentiation of acetylcholine responses (a); this effect is sensitive to atropine (b)

Muskarinski acetilholinski receptor (mAChR) nematoda kao mesto delovanja antihelmintika / Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) of nematodes as site of action of anthelmintics

Muskarinski receptor reguliše funkcije neurona i mišićnih ćelija preko G-kuplovanih kaskadnih reakcija. Na osnovu ranijih rezultata pošli smo od pretpostavke da klasični muskarinski receptor postoji kod nematoda i da on može biti novo farmakološko ciljno mesto za razvoj novih antinematodnih lekova. Na osno-

vu dobijenih rezultata istraživanja efekt muskarinskog agoniste metilfurmetiodida na potencijal membrane mišićne ćelije *Ascaris suum* je dozno-zavisan i osetljiv na klasične muskarinske antagoniste atropin i 4-DAMP. Ove receptorske strukture zahtevaju dalja detaljna ispitivanja radi definisanja njihove uloge u nervno-mišićnom sistemu nematoda i određivanja mogućnosti da budu iskorišćene u razvoju novih antinematodnih lekova (slika 4) (Trailović i sar., 2008)



Slika 4. Dozno zavisni efekt muskarinskog agoniste metilfurmetijodida na depolarizaciju membrane mišićne ćelije *A. suum*

Figure 4. Dose-dependent effect of muscarinic agonist 5-methylurmethiodide on the *A. suum* muscle cells membrane depolarization

Da su holinergički receptori nematoda atraktivna ciljna mesta za anti-nematodne lekove govori i činjenica da najnovija klasa antihelmintika, nazvana aminoacetonitrili (AAD), deluje upravo na nikotinski receptor. AAD su klasa jedinjenja male molekulske mase, koji se relativno lako dobijaju alkilacijom fenola hloracetonom. Do sada je sintetisano preko 600 jedinjenja sa različitim ariloksi ili aroil grupama u aminoacetonitrilnom jezgru.

Inicijalna ispitivanja efikasnosti kod preživara pokazala su da neki od testiranih AADs efikasno eliminišu larve 4. stadijuma (L4) *H. contortus* i *Teladorsagia spp.* kod ovaca i *Cooperia oncophora* kod goveda (Stein i sar., 2010). Pri tome, pojedini predstavnici AADs su se izdvojili po izrazitoj efikasnosti, koja se kreće od 90 do 100%, protiv *Nematodirus spathier*, *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* i *Trichostrongylus columbiformis* kod ovaca (Sager i sar., 2009).

Monepantel – novi antihelmintički lek / *Monepantel – new anthelmintic drug*

Monepantel je prvi lek iz grupe aminoacetonitrila koji se pojavio kao najozbiljniji kandidat za registraciju u veterinarskoj medicini. Kako je Evropska agencija za lekove (EMA) već odredila vrednosti maksimalno dozvoljenih koncentracija rezidua monepantela u mesu ovaca i koza, očekuje se vrlo brza cen-

tralna registracija ovog leka u EU (Kaminsky i sar., 2008). Izrazita efikasnost monepantela (skoro 100%-tna) potvrđena je i kod prirodnih i kod veštački izazvanih infekcija ovaca gastrointestinalnim nematodama (Sager i sar., 2009). Kao efektivna peroralna doza monepantela određena je doza od 2,5 mg/kg telesne mase (Hosking i sar., 2008; Kaminsky i sar., 2009; Hosking i sar., 2009a). Pojedini izolati gastrointestinalnih nematoda korišćenih za izazivanje eksperimentalnih infekcija imali su razvijenu rezistenciju na benzimidazole ili levamizol, što je bilo izuzetno važno za procenu efikasnosti monepantela. Za većinu testiranih nematoda (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Cooperia curticei*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicollis*, *Oesophagostomum venulosum*, *Chabertia ovina*), posle veštačke infekcije, efikasnost monepantela iznosila je preko 98%, izuzev za *Oesophagostomum venulosum* gde je redukcija broja parazita iznosila 88%. Sličnu efikasnost monepantel je ispoljio i kod ovaca koje su bile prirodno inficirane, pa je i u ovom slučaju za većinu vrsta nematoda efikasnost ovog aminoacetontrila iznosila preko 99% (Hosking i sar., 2009b; Hosking i sar., 2010a; Bustamante i sar., 2009; Mason i sar., 2009).

U farmakokinetičkim ispitivanjima, kao potencijalno novi lek monepantel je ispoljio dobre farmakokinetičke osobine, kao i većina ostalih testiranih derivata aminoacetonitrila. Međutim, uprkos ovoj činjenici karenca će najverovatnije biti relativno dugačka (Karadzovska i sar., 2009; Hosking i sar., 2010b).

Do sada se često dešavalo da potencijalno perspektivne antihelminičke supstance ne prođu dalje od prekliničkih ispitivanja zbog toksičnosti za sisare. Ovaj put svi AAD su ispoljili nisku toksičnost kod glodara i preživara. Oralna letalna doza derivata aminoacetonitrila kod pacova iznosi preko 2 g/kg telesne mase. Ispitivanja podnošljivosti različitih AAD, takođe su pokazala da se radi o jedinjenjima koja sisari dobro podnose (Malikides i sar., 2009a; Malikides i sar., 2009b; Malikides i sar., 2009c; Hosking i sar., 2009c).

Zaključak / Conclusion

U veterinarskoj kliničkoj praksi već duži niz godina primenjuje se nekoliko grupa holinomimetičkih antihelmintika, kao što su: imidazotiazoli (levamizol, tetramizol), tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel) i organofosfatni antihelminici. Mehanizam antihelminičkog delovanja sve tri navedene grupe lekova je isti. Oni deluju kao direktni ili indirektni agonisti nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda. U međuvremenu, primena nekih od ovih antihelmintika je gotovo potpuno napuštena (organofosfatna jedinjenja), dok je prema ostalima zbog dugotrajnije upotrebe, u većoj ili manjoj meri, došlo do razvoja rezistencije. Otuda se nametnula potreba za novim efikasnim antihelminnikom. Istraživanja koja se sprovode u tom pravcu očigledno pokazuju da je

nikotinski receptor nematoda i dalje atraktivno mesto za delovanje antinematodnih lekova. U prilog tome govori i najnovija klasa sintetisanih antihelmintika – aminoacetonitrila (AAD), koji takođe deluju preko ovog receptora. Monepantel je prvi lek iz grupe AAD, kao najozbiljniji kandidat za registraciju u veterinarskoj medicini.

Literatura / References

1. Adams R. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8th Ed. Iowa State University Press Iowa, USA. 2001.
2. Bustamante M, Steffan EP, Morlán BJ, Echevarria F, Fiel AC, Cardozo H, Castells D, Hosking CB. The efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against gastrointestinal nematodes of sheep in three countries of southern Latin America. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 139-44.
3. Hosking CB, Stein AP, Mosimann D, Seewald W, Strehlau G, Kaminsky R. Dose determination studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Vet Parasitol* 2008; 157(1-2): 72-80.
4. Hosking CB, Dobson PD, Stein AP, Kaminsky R, Bapst B, Mosimann D, Mason CP, Seewald W, Strehlau G, Sager H. Dose confirmation studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Vet Parasitol* 2009a; 160: 251-7.
5. Hosking CB, Griffiths MT, Woodgate GR, Besier BR, Le Feuvre AS, Nilon P, Trengove C, Vanhoff JK, Kaye-Smith GB, Seewald W. Clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, compared with registered anthelmintics against gastrointestinal nematodes of sheep in Australia. *Aust Vet J* 2009b; 87(11): 455-62.
6. Hosking CB, Stein AP. Effect of fasting sheep for a short period on the efficacy and safety of monepantel. *Vet Rec* 2009c; 165: 50-2.
7. Hosking CB, Kaminsky R, Sager H, Rolfe FP, Seewald W. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Res* 2010a; 106(2): 529-32.
8. Hosking CB, Stein AP, Karadzovska D, House KJ, Seewald W, Giraudel MJ. Effect of route of administration on the efficacy and pharmacokinetics of an experimental formulation of the amino-acetonitrile derivative monepantel in sheep. *Vet Rec* 2010b; 166: 490-4.
9. Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet Weber S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking BC, Pautrat F, Wieland-Berghausen S, Ducray P. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res* 2008; 103(4): 931-9.
10. Kaminsky R, Mosimann D, Sager H, Stein P, Hosking B. Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *Int J Parasitol* 2009; 39(4): 443-6.
11. Karadzovska D, Seewald W, Browning A, Smal M, Bouvier J, Giraudel MJ. Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 2009; 32(4): 359-67.

12. Kočehlep P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* 2001; 313: 36-345.
13. Malikides N, Helbig R, Roth DR, Alexander A, Hosking CB, Strehlau GA. Safety of an amino-acetonitrile derivative (AAD), monepantel, in weaned lambs following repeated oral administration. *N Z Vet J* 2009a; 57(1): 10-5.
14. Malikides N, Helbig R, Mahoney R, George B, Baker K, Vanhoff K, Spencer K, Hall C, Debenedetti R, Strehlau GA. Reproductive safety of an amino-acetonitrile derivative (AAD), monepantel, in rams following repeated oral administration. *N Z Vet J* 2009b; 57(1): 16-21.
15. Malikides N, Spencer K, Mahoney R, Baker K, Vanhoff K, Hall C, Debenedetti R, Strehlau GA. Safety of an amino-acetonitrile derivative (AAD), monepantel, in ewes and their offspring following repeated oral administration. *N Z Vet J* 2009c; 57(4): 193-202.
16. Mason PC, Hosking CB, Nottingham RM, Cole DJ, Seewald W, McKay CH, Griffiths TM, Kaye-Smith BG, Chamberlain B. A large-scale clinical field study to evaluate the efficacy and safety of an oral formulation of the amino-acetonitrile derivative (AAD), monepantel, in sheep in New Zealand. *N Z Vet J* 2009; 57(1): 3-9.
17. Rayes D, De Rosa MJ, Bartos M, Bouzat C. Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole. *J Biol Chem* 2004; 279(35): 36372-81.
18. Robertson AP, Martin RJ. Ion-channels on parasite muscle: pharmacology and physiology. *Invert Neurosci* 2007a; 7: 209-17.
19. Robertson AP, Martin RJ. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology* 2007b; 134: 1093-104.
20. Sager H, Hosking B, Bapst B, Stein P, Vanhoff K, Kaminsky R. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 2009; 159: 49-54.
21. Stein AP, Rolfe FP, Hosking CB. The control of inhibited fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia spp.* in sheep in Australia with monepantel. *Vet Parasitol* 2010; 169: 358-61.
22. Trailovic SM, Robertson AP, Clark CL, Martin RJ. Levamisole receptor phosphorylation: effects of kinase antagonists on membrane potential responses in *Ascaris suum* suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole. *J Exp Biol* 2002; 205(24): 3979-88.
23. Trailovic SM, Clark CL, Robertson AP, Martin RJ. Brief application of AF2 produces long lasting potentiation of nAChR responses in *A. suum*. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 139: 51-64.
24. Trailovic SM, Verma S, Clark CL, Robertson AP, Martin RJ. Effects of the muscarinic agonist, 5-methylfurfurmethiodide, on contraction and electrophysiology of *Ascaris suum* muscle. *Int J Parasitol* 2008; 38(8-9): 945-57.

ENGLISH

PHARMACOLOGICAL RECEPTORS OF NEMATODA AS TARGET POINTS FOR ACTION OF ANTIPARASITIC DRUGS

S. M. Trailović, S. R. Ivanović, Jelena Nedeljković Trailović, A. P. Robertson

Cholinergic receptors of parasitic nematodes are one of the most important possible sites of action of antiparasitic drugs. This paper presents some of our own results of electrophysiological and pharmacological examinations of nicotinic and muscarinic receptors of nematodes, as well as data from literature on a new class of anthelmintics that act precisely on cholinergic receptors. The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is located on somatic muscle cells of nematodes and it is responsible for the coordination of parasite movement. Cholinomimetic anthelmintics act on this receptor, as well as acetylcholine, an endogenous neurotransmitter, but they are not sensitive to enzyme acetylcholinesterase which dissolves acetylcholine. As opposed to the nicotinic receptor of vertebra, whose structure has been examined thoroughly, the stoichiometry of the nicotinic receptor of nematodes is not completely known. However, on the grounds of knowledge acquired so far, a model has been constructed recently of the potential composition of a type of nematodes nicotinic receptor, as the site of action of anthelmintics. Based on earlier investigations, it is supposed that a conventional muscarinic receptor exists in nematodes as well, so that it can also be a new pharmacological target for the development of antinematode drugs. The latest class of synthesized anthelmintics, named aminoacetonitriles (AAD), act via the nicotinic receptor. Monepantel is the first drug from the AAD group as a most significant candidate for registration in veterinary medicine. Even though several groups of cholinomimetic anthelmintics (imidazothiazoles, tetrahydropyrimidines, organophosphat anthelmintics) have been in use in veterinary practice for many years now, it is evident that cholinergic receptors of nematodes still present an attractive place in the examinations and development of new antinematode drugs.

Key words: antiparasitic drugs, nicotinic receptor, muscarinic receptor, aminoacetonitriles (AAD)

РУССКИЙ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ НЕМАТОДОВ КАК ЦЕЛЕВЫЕ МЕСТА ДЕЙСТВИЯ АНТИПАРАЗИТАРНЫХ ЛЕКАРСТВ

Саша М. Траилович, Саша Р. Иванович, Елена Неделькович Траилович, Алан П. Робертсон

Холинергические рецепторы паразитарных нематодов одно из самых значительных возможных мест действия антипаразитарных лекарств. В этой работе показаны некоторые из собственных результатов электрофизиологических и фармакологических испытаний никотинового и мускаринового рецепторах нематод, словно и литературные данные о новом классе антигельминтиков, действующие как раз на холинергические рецепторы. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (НАЦХР) находится на соматических мышечных клетках нематод и ответственный

для координации движения паразитов. Холиномиметические антигельминтики действуют на этот рецептор словно и ацетилхолин, эндогенный нейротрансмитер, но не чувствительные к энзиму ацетилхолин-эстераз, расщепляющий ацетилхолин. В отличие от никотинового рецептора *vertebrata*-позвоночные, чья структура хорошо испытана, стехиометрия никотинового рецептора нематод не полностью известна. Между тем, в предстоящее время на основе бывших до сих пор познаний конструирована модель потенциального состава одного вида никотинового рецептора нематод, как места действия антигельминтиков. На основе более ранних исследований существует предпосылка, что классический мускариновый рецептор существует и у нематод, так, что и он может быть новая фармакологическая цель - таргет для развития анинематодных лекарств. Наиболее новый класс синтетических антигельминтиков, названный аминокетонитрилы (ААН), действует через никотиновый рецептор. Монепантел перов лекарство из группы ААН как самый значительный кандидат для регистрации в ветеринарной медицине. Хотя ветеринарной клинической практике уже более долгий ряд лет применяется несколько групп холиномиметических антигельминтиков (имидазотиазолы, тетрагидропиримидины, органофосфатные антигельминтики), очевидно, что холинергические рецепторы нематод и дальше представляет собой атрактивное место в испытании и развитии новых анинематодных лекарств.

Ключевые слова: антипаразитарные лекарства, никотиновый рецептор,
мускариновый рецептор, аминокетонитрилы (ААН)

FARMAKOTERAPIJA KANCERSKOG BOLA KOD PASA I MAČAKA*

PHARMACOTHERAPY OF CANCER PAIN IN DOGS AND CATS SUFFERING FROM CANCER

Mirjana Milovanović, M. Jovanović, Sonja Vučković, Milica Prostran**

U patogenezi kancera značajno mesto zauzima bol, kao prateći simptom ovog teškog patološkog stanja. Bol koji prati kancer je hroničnog toka i srednje jakog do jakog intenziteta, tako da ozbiljno narušava kvalitet života pacijenata obolelih od ove bolesti. Terapija kancerskog bola kod pasa i mačaka sprovodi se primenom lekova iz različitih farmakoloških grupa. To su pre svega neopioidni i opioidni analgetici, antagonisti NMDA receptora, antikonvulzivni lekovi, triciklični antidepresivi i steroidni antiinflamatorni lekovi. Neki lekovi su registrovani za upotrebu u veterinarskoj medicini, a neki se preuzimaju iz palete lekova namenjenih za primenu u humanoj medicini.

Ključne reči: analgetici, bol, karcinom, mačke, psi

Uvod / Introduction

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (International Association for the Study of Pain – IASP). Da bi ova definicija bola mogla da se primeni u veterinarskoj kliničkoj praksi, izvršena je njena modifikacija, pa se bol objašnjava kao averzivno senzorno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, koje dovodi do progresivnih motornih ili vegetativnih reakcija, primorava životinju da nauči kako da izbegne bol i može da izmeni ponašanje karakteristično za datu vrstu, uključujući i socijalno ponašanje.

Po dužini trajanja bol može biti akutan, subakutan i hroničan. Kancerski bol spada u hroničan bol srednje jakog ili jakog intenziteta, koji prati patoge-

* Rad primljen za štampu 20. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Mirjana Milovanović, asistent, dr sci. med. vet. Milan Jovanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. Sonja Vučković, vanredni profesor, dr sci. med. Milica Prostran, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, R Srbija

nezu kancerske bolesti od njenog početka do terminalne faze. Međutim, dokazano je da nisu svi tumori praćeni bolom. Prema navodima Duncan i Lascelles (2007), 30% tumora kod pasa i mačaka prate jasno uočljivi znaci bola u trenutku postavljanja dijagnoze. Najčešće su to maligni procesi koji su primarno lokalizovani u usnoj duplji, na kostima, urogenitalnom sistemu, očima, nosnoj duplji, kičmenom stubu, gastrointestinalnom (GI) sistemu i koži. Ono što je važno istaći jeste činjenica da je prag bola individualna kategorija koja zavisi i od uzrasta životinje (mlade jedinke su osetljivije od starih jedinki). Pored toga, kancer je bolest praćena bolom koji nastaje usled primene kauzalne terapije (hemioterapije, radiološke terapije), kao i usled hirurških intervencija (postoperativni bol).

Polazno stanovište za kontrolu bola kod onkoloških pacijenata treba da bude način utvrđivanja intenziteta bola. To često nije lako i zahteva tesnu saradnju vlasnika životinje i veterinara. Procena kancerskog bola se bazira na posmatranju i registrovanju promena u ponašanju životinje, kao i reakciji na bol prilikom pregleda (palpacije) tumorskog tkiva kada je to moguće (Brearley i Brearley, 2001).

Farmakoterapija kancerskog bola / *Pharmacotherapy of cancer pain*

Kancerski bol se kod pasa i mačaka kontroliše primenom lekova sa analgetičkim dejstvom kao što su: nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), opioidni analgetici, antagonisti N-metil D-aspartat (NMDA) receptora, antikonvulzivni lekovi, triciklični antidepresivi i glukokortikoidi.

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)/

Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID)

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi su posebna farmakodinamska grupa lekova, poznata pod nazivom antipiretički analgetici, neopiodni analgetici ili nesteroidni antireumatici. Primenjuju se naširoko, kako u humanoј tako i veterinarskoј kliničkoј praksi, za otklanjanje, ublažavanje i kontrolu bola slabog do srednje umerenog intenziteta (analgetičko dejstvo), lečenje upala kostiju i mekih tkiva (antiinflamatorno dejstvo), kao i za snižavanje povišene telesne temperature (antipiretičko dejstvo).

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi svoje analgetičko delovanje ostvaruju inhibicijom sinteze prostaglandina koji senzitiviju nociceptore prema mehaničkim i hemijskim stimulusima (histamin, bradikinin, serotonin) (Vučković i sar., 2007). Tačnije, ovi lekovi inhibišu aktivnost ciklooksigenaze (COX) enzima odgovornog za sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. U organizmu životinja i ljudi ciklooksigenaza je prisutna u dva izo-oblika i to: ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2). Ciklooksigenaza-1 je konstitutivni enzim odgovoran za sintezu prostaglandina koji učestvuju u brojnim fiziološkim procesima u organizmu. U novije vreme, COX-1 detektovana u mozgu definiše se kao

COX-3 (Hersh i sar., 2005). Nasuprot tome, COX-2 je inducibilni enzim koji se aktivira samo kada je tkivo u zapaljenju (Rang, 2005). Indukovana COX-2 katalizuje prekomernu produkciju prostaglandina (PGE_2 , PGI_2) koji, između ostalog, imaju značajnu ulogu u razvoju i progresiji kancera (Tennis i sar., 2010). Dokazano je da ekspresija COX-2 u kancerskoj ćeliji inhibiše apoptozu, olakšava adheziju kancerskih ćelija za zdravo tkivo, podstiče rast i angiogenezu tumora (Raegg i Dormon, 2001; Koki i sar., 2002). Tako je kod pasa obolelih od karcinoma mokraćne bešike, bubrega, mlečne žlezde, creva, kože, sluzokože nosa i osteosarkoma utvrđeno značajno povećanje ekspresije COX-2 (Khan i sar., 2001; Knottenbelt i sar., 2006; Lavallo i sar., 2009). Slični rezultati dobijeni su i kod ljudi obolelih od različitih vrsta karcinoma (karcinom pluća, mokraćne bešike, kolona, pankreasa, prostate...) (Sobolewski i sar., 2010). Usled velikog uticaja COX-2 i prostaglandina (PGE_2 , PGI_2) u patogenezi karcinoma, opravdana je primena NSAIL u prevenciji kolorektalnog karcinoma kod ljudi nekoliko godina unazad, a razmatra se i uključivanje ovih lekova u protokol lečenja određenih vrsta karcinoma (Baron, 2003).

U terapiji kancerskog bola kod malih životinja primenjuju se paracetamol i sledeći NSAIL: karprofen, ketoprofen, meloksikam, piroksikam, etodolak, aspirin, tepoksalin, derakoksib i firokoksib (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Paracetamol je derivat anilina. Deluje analgetički i antipiretički tako što inhibiše ekspresiju COX-3 u CNS-u. Za otklanjanje i kontrolu akutnog bola kod pasa primenjuje se peroralno (p.o.) u dozi od 10-15 mg/kg t.m. na 8h, tokom 5 dana. Duža primena ovog leka zahteva korekciju doze i režima doziranja na 5-10 mg/kg na 12h. Osim toga, paracetamol (10-15 mg/kg) se može kombinovati sa kodeinom (0,5-2 mg/kg). Oba leka daju se p.o. na 12h. Prednost paracetamola u odnosu na NSAIL je u tome što ne ispoljava toksične efekte na sluzokožu GI sistema i nije toksičan za bubrege. Duža primena paracetamola kod pasa može da prouzrokuje neželjene efekte kao što su: depresija, povraćanje i hemoglobinemija. Nabrojana neželjena dejstva su dozno-zavisna i reverzibilna. Paracetamol se ne primenjuje kod mačaka, zbog izražene hepatotoksičnosti (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009; Jezdimirović, 2010).

Karprofen je NSAIL koji ispoljava veću selektivnost prema COX-2. Kod pasa se primenjuje za otklanjanje i kontrolu bola umerenog do jakog intenziteta. Peroralna doza ovog leka za psa iznosi 2 mg/kg t.m. na 12h ili 4 mg/kg na 24h. Kod mačaka se može primenjivati za otklanjanje akutnog bola jednokratno u dozi od 4 mg/kg, intramuskularno (i.m.) ili subkutano (s.c.). Tretman ovim lekom se kod mačaka može ponoviti još jednom, nakon 24 časa. Duža primena karprofena kod pasa može da prouzrokuje oštećenje sluzokože želuca i creva, oštećenje funkcije jetre i bubrega i poremećaj koagulacije. Nabrojana neželjena dejstva su češća kod pasa rase labrador i retriever (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009; Jezdimirović, 2010).

Ketoprofen je potentan NSAIL koji inhibiše sintezu prostaglandina, leukotriena, kao i aktivnost bradikininina. Ovaj lek se primenjuje za otklanjanje akutnog bola kod pasa i mačaka. Peroralna doza za pse iznosi 2 mg/kg dnevno, a potom 1 mg/kg dnevno, tokom 5 dana. Duža primena ketoprofena kod pasa podrazumeva korekciju doze na 0,25 mg/kg dnevno, maksimalno 30 dana. Mačkama se daje p.o. u dozi od 1 mg/kg dnevno tokom 5 dana. Ketoprofen ne treba davati pre i posle hirurške intervencije, zbog mogućeg krvarenja (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009; Jezdimirović, 2010).

Meloksikam je NSAIL koji ispoljava nešto veću selektivnost prema COX-2. Primenjuje se za ublažavanje i otklanjanje akutnog bola i kontrolu hroničnog bola kod pasa i mačaka. Peroralna doza za psa iznosi 0,2 mg/kg prvog dana, a zatim 0,1 mg/kg dnevno. Kod mačaka se meloksikam primenjuje p.o. u dozi od 0,1 mg/kg prvog dana, 0,05 mg/kg tokom naredna 4 dana, a zatim 0,05 mg/kg svakog drugog dana ili 0,025 mg/kg dnevno (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009; Jezdimirović, 2010).

Piroksikam, kao i meloksikam spada u oksikame. Kod pasa se primenjuje u lečenju osteoartritisa, a zabeleženo je da kod ovih životinja deluje i antitumorigeno tj. da smanjuje veličinu nekih vrsta tumora kao što su: karcinom mlečne žlede, sarkom mekih tkiva, karcinom m. bešike (Greene i sar., 2007; Elmslie i sar., 2008; de M Souza, 2009). Za kontrolu hroničnog bola kod pasa obolelih od karcinoma piroksikam se primenjuje p.o. u dozi od 0,3 mg/kg na 48h. Mačkama se ovaj lek daje sa posebnim oprezom zbog mogućeg krvarenja u GI traktu. Peroralna doza za mačke iznosi 1mg/mački, tokom 7 dana. Duža primena podrazumeva davanje piroksikama u istoj dozi svaki drugi dan, ali je praćena visokom incidencom hemoragija u GI traktu (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Jezdimirović, 2010).

Etodolak se primenjuje za lečenje akutnog bola, kontrolu hroničnog bola i lečenje osteoartritisa kod pasa. Ovim životinjama se etodolak daje p.o. u dozi od 5-15 mg/kg jednom dnevno. Moguća neželjena dejstva ovog leka su povraćanje, dijareja i mišićna slabost, a zapažena su kod pasa kojima je ovaj lek aplikovan u trostruko većoj dozi od preporučene. Etodolak nije indikovani za mačke (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Jezdimirović, 2010).

Aspirin odnosno acetilsalicilna kiselina je prvi NSAIL koji je našao primenu u humanoj, a zatim i veterinarskoj kliničkoj praksi. Zbog izraženih neželjenih efekata na gastrointestinalni sistem, bubrege, jetru i koagulaciju krvi, duža primena ovog leka kod pasa, a naročito kod mačaka se ne preporučuje. Kod pasa se za kontrolu hroničnog bola aspirin primenjuje p.o. u dozi od 10 mg/kg na 12h, a kod mačaka u istoj dozi na 48h. Primena aspirina je kontraindikovana kod životinja kod kojih će biti izveden hirurški zahvat (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Jezdimirović, 2010).

Tepoksalin je NSAIL koji inhibiše ciklooksigenazu i lipooksigenazu. Za kontrolu kancerskog bola kod pasa se primenjuje p.o. u dozi od 10-20 mg/kg prvog dana, a zatim u dozi od 10 mg/kg dnevno. Zbog izraženog antiinflamatornog dejstva, tepoksalin ispoljava veću analgetičku aktivnost kod karcinoma udruženih sa inflamacijom. Duža primena ovog leka zahteva stalni veterinarski nadzor i povremeni prekid terapije. Tepoksalin se ne propisuje mačkama (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007 Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009).

Derakoksib i firokoksib su NSAIL najnovije generacije. Spadaju u selektivne inhibitore ciklooksigenaze-2 (COX-2 inhibitori), pa su stoga daleko bezbedniji u odnosu na starije NSAIL. Naime, ovi koksibi štede sluzokožu GI sistema i ne deluju toksično na bubrege i jetru (Vučković i sar., 2007). Za kontrolu hroničnog bola kod pasa, derakoksib se primenjuje p.o. u dozi od 1-2 mg/kg, a firokoksib p.o. u dozi od 5 mg/kg jednom dnevno. Derakoksib i firokoksib se ne primenjuju kod pasa sa ulceracijama u GI traktu (zbog usporavanja reparacije oštećenog tkiva), kao i kod gravidnih i kuja u laktaciji. Takođe, ovi lekovi se ne propisuju psima mlađim od 4 meseca. Koksibe ne treba davati mačkama, jer njihovo delovanje na ovu vrstu nije još dovoljno ispitano (Duncan i Lascelles, 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009).

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi su pogodni za primenu u otklanjanju i ublažavanju akutnog, kao i u kontroli hroničnog bola kod životinja. Pogodnost njihove primene ogleda se, pre svega, u tome što je većina lekova iz ove farmakodinamske grupe registrovana za veterinarsku kliničku praksu tj. nalazi se u paleti veterinarskih lekova mnogih farmaceutskih fabrika. Međutim, nedostatak primene NSAIL, posebno u kontroli kancerskog bola, leži u činjenici da ovi analgetici ne deluju dovoljno snažno na bol jakog intenziteta. Osim toga, NSAIL ispoljavaju i neželjene efekte na GI sistem (gastritis, ulceracije sluzokože želuca i creva), bubrege (akutna bubrežna insuficijencija, papilarna nekroza), jetru (akutna insuficijencija jetre) i hematopoezni sistem, koji su u korelaciji sa dužinom tretmana. Pored toga, mačke su posebno osetljive na NSAIL zbog manjka glukuronil transferaze, enzima odgovornog za biotransformaciju ovih lekova u hepatocitima. S obzirom na to da kancer obično ima hronični tok, jasno je da incidenca pojave neželjenih efekata NSAIL primenjenih u kontroli kancerskog bola kod pasa i mačaka značajna. Neželjeni efekti NSAIL na GI sistem se donekle mogu ublažiti primenom sintetskog prostaglandina mizoprostola i inhibitora protonske pumpe omeprazola. Mizoprostol se psima daje p.o. u dozi od 2-5 µg/kg, a mačkama u istoj dozi na 12h. Omeprazol se kod pasa i mačaka primenjuje p.o. u dozi od 0,5-1 mg/kg dnevno. Takođe, jedan od načina da se izbegnu neželjeni efekti usled duže primene NSAIL kao analgetika jeste i kombinovana primena neopioidnih i opioidnih analgetika u subefektivnim pojedinačnim dozama (Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Jezdimirović, 2010).

Opioidni analgetici / *Opioid analgesics*

Narkotički analgetici – opioidi efikasni su kod bolova jakog intenziteta kakav je često i kancerski bol. U humanoj kliničkoj praksi su na prvom mestu u terapiji bola kod onkoloških pacijenata. Njihovu dužu primenu prati razvoj tolerancije i fizičke zavisnosti, što ne bi trebalo da bude prepreka za primenu ovih analgetika kod pacijenata sa kancerskim bolom. Opioidni analgetici aktiviraju opioidne receptore (μ , κ , δ -receptori) u CNS-u, ali i na periferiji, koji onda smanjuju ekscitabilnost neurona i oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera. Kod pasa opioidni analgetici (morfin i njemu slična jedinjenja) deluju depresivno na CNS. Nasuprot tome, kod mačaka i nekih drugih vrsta (konj, goveče, koza, ovca, svinja) ovi lekovi mogu da prouzrokuju ekscitaciju. Osim toga, neželjeni efekti, kao što su povraćanje, sedacija i konstipacija, dodatno otežavaju primenu opioida u kontroli hroničnog bola kod pasa i mačaka obolelih od karcinoma. I na kraju, problem zabrane distribucije opioidnih analgetika za primenu u veterinarskoj medicini, čini ove lekove nedostupnim za veterinarsku kliničku praksu (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007; Čupić i sar., 2007; Jezdimirović, 2010).

Morfin je fenantrenski alkaloid opijuma sa narkotičko-analgetičkom aktivnošću. Nosi epitet "božanskog leka" za otklanjanje bola i predstavlja jedinicu mere analgetičke aktivnosti svih ostalih opioidnih analgetika. Morfin se psima daje p.o. u dozi od 0,2-0,5 mg/kg na 6-8h ili 0,5-3 mg/kg na 8-12h. Sedacija i opstipacija su neželjeni efekti koji su dozno-zavisni, pa se kod primene morfina u većim dozama ($>0,5$ mg/kg) javljaju sa visokom incidencom. Zbog toga je preporuka da se doza morfina kod pasa postepeno povećava. Za kontrolu kancerskog bola kod mačaka, morfin se daje p.o. u dozi od 0,2-0,5 mg/kg 3 do 4 puta na dan. Međutim, zbog moguće ekscitacije, kod ove vrste životinja morfin se primenjuje sa izvesnim oprezom (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Kodein ili metil morfin je takođe sastojak opijuma, koji se dobija metilacijom morfina. Za kontrolu hroničnog bola kodein se psima daje p.o. u dozi od 0,5-2 mg/kg na 8-12h. Sedacija i opstipacija su mogući neželjeni efekti ovog leka i oni su dozno-zavisni. Kodein se ne primenjuje kod mačaka (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Fentanil je sintetski opioidni analgetik, čija je analgetička aktivnost oko 100 puta veća od morfina. Fentanil u obliku transdermalnog flastera se primenjuje kod pasa u dozi od 2-5 μ g/kg/h. To znači da se kod pasa srednje veličine i velikih pasa, transdermalni flaster menja na 12-36h, a najduže za 72 h od postavljanja. Flaster se stavlja na obrijanu kožu na mestu gde ga životinja teško može skinuti (greben vrata). Fentanil u obliku transdermalnog flastera može da se primeni kod velikih mačaka. U tom slučaju uzima se flaster najmanje veličine (25 μ g/h fentanila). Dužina izlaganja ovom leku kod mačaka je do 120h. Transdermalni flaster sa fentanilom se ne sme seći. Neželjeni efekti fentanila koji se mogu javiti kod pasa i mačaka su letargija, smanjen apetit i pad telesne temperature. Praktičan problem u primeni transdermalnog flastera sa fentanilom kod pasa i

mačaka je i taj što je površina kože na koju se može stavljati flaster ograničena (u odnosu na ljude), pa se ovaj lek ne može dugo koristiti za kontrolu hroničnog bola (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Butorfanol je derivat morfina. Za kontrolu hroničnog bola kod pasa se daje p.o. u dozi od 0,2-0,5 mg/kg na 8 h, a kod mačaka 0,5-1 mg/kg na 6h. Butorfanol postiže slabiji analgetički efekat kod mačaka nego kod pasa. Pored toga, zapaženo je da kod mačaka butorfanol utiče na ponašanje, tako da one postaju privrženije vlasniku i ispoljavaju veću potrebu za maženjem. Neželjeni efekat ovog leka kod pasa je sedacija, a kod mačke midrijaza koja je dozno-zavisna (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009).

Buprenorfin je derivat tebaina, sa molekulskom strukturom sličnom morfinu. Analgetička aktivnost buprenorfina je oko 30 puta veća od morfina. Ovaj lek ima osobinu da se sporo vezuje i odvaja od opioidnih receptora, te stoga njegov analgetičko dejstvo sporo nastupa ali zato duže traje. Buprenorfin je efikasniji u kontroli hroničnog bola kod mačaka nego kod pasa. Interesantan je podatak da je analgetički efekat buprenorfina bolji kada se mačkama aplikuje oralno tj. bukalno (0,02 mg/kg na 6-7h) u odnosu na parenteralnu primenu (0,01-0,02 mg/kg, i.m.), koja je ograničena na jedno do dva davanja leka u razmaku od 2h. Na tržištu USA ovaj lek se nalazi i u obliku transdermalnog flastera. Povraćanje i disforija, kao neželjeni efekti, veoma se retko javljaju kod mačaka (Robertson i Taylor, 2004; Duncan i Lascelles, 2007; Compendium of Data Sheets, NOAH, 2009).

Tramadol je sintetski analgetik sa centralnim dejstvom. Analgetička aktivnost tramadola slična je onoj kod opioda. U kontroli kancerskog bola kod pasa tramadol se primenjuje p.o. u dozi od 4-5 mg/kg, a kod mačaka u dozi od 1-2 mg/kg na 12h. Kod pasa se bolja analgetička aktivnost tramadola postiže kombinovanom primenom sa paracetamolom ili NSAIL, a kod mačaka kombinovanom primenom sa nekim NSAIL (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Antagonisti N-metil D-aspartat (NMDA) receptora / *Antagonists of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors*

U ovu farmakodinamsku grupu lekova spadaju ketamin, tiletamin, dekstrometorfan i amantadin. Za kontrolu kancerskog bola kod pasa i mačaka primenjuje se **amantadin**. Ovaj lek se psima i mačkama aplikuje p.o. u dozi od 4-5 mg/kg za pse i u dozi od 3-5 mg/kg za mačke, dnevno. Posebno se dobrom pokazala kombinovana primena amantadina i NSAIL u kontroli kancerskog bola. Neželjeni efekti amantadina mogu da se jave u vidu uznemirenosti i dijareje, ali su prolaznog karaktera i češći su kod pasa nego kod mačaka. **Ketamin** je takođe dobar analgetik, posebno za mačke, ali ne postoji prikladan farmaceutski oblik ovog leka za p.o. primenu. Za kontrolu neuropatskog bola kod ljudi ketamin se prime-

njuje lokalno u obliku gela. Eventualna iskustva u primeni ovog farmaceutskog oblika ketamina kod mačaka nisu publikovana (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Antikonvulzivni lekovi / *Anticonvulsant drugs*

Gabapentin je strukturni analog gama-aminobuterne kiseline (GABA) koji se primenjuje u lečenju epilepsije kod ljudi i pasa. U novije vreme ovaj lek se koristi u lečenju neuropatskog bola kod ljudi (dijabetička neuropatija, amputacija ekstremiteta) i pasa (amputacija ekstremiteta). Za kontrolu kancerskog bola kod pasa gabapentin se primenjuje p.o. u dozi od 3-10 mg/kg dva do tri puta dnevno. Međutim, analgetička aktivnost ovog leka kod pasa sa kancerskim bolom nije dovoljno izražena. Razlog tome je brza biotransformacija kojoj podleže gabapentin kod ove vrste životinja. Stoga se bolji analgetički efekat dobija kombinovanom primenom gabapentina i nekog NSAIL. Mačkama se gabapentin daje p.o. u dozi od 1-4 mg/kg na 24h (Duncan i Lascelles, 2007).

Triciklični antidepresivi / *Tricyclic antidepressants*

Amitriptilin je triciklični antidepresiv koji se kod pasa i mačaka primenjuje za lečenje poremećaja u ponašanju vezanim za depresiju. Takođe, ovaj lek je efikasan i u kontroli bola kod hroničnog (idiopatskog) cistitisa mačaka, za ublažavanje neuropatskog bola nastalog usled oštećenja nerava, kao i u otklanjanju tegoba kod hroničnog pruritusa pasa i mačaka (antihistaminski efekat). Za kontrolu kancerskog bola amitriptilin se psima i mačkama daje p.o. u dozi od 0,5-2 mg/kg dnevno, tokom 12 meseci. Psi i mačke dobro podnose ovaj lek. Moguća neželjena dejstva su ekstremna pospanost, suvoća usta i očiju, pojačana žeđ, hipotenzija, nauzeja, smanjen apetit. Amitriptilin se može kombinovati sa NSAIL. Ovaj lek se ne daje zajedno sa tramadolom, zbog nedovoljno izučene interakcije (Duncan i Lascelles, 2007).

Imipiramin je triciklični antidepresiv koji se primenjuje u lečenju tegoba vezanih za urinarnu inkontinenciju kod starih pasa. U kontroli hroničnog, kancerskog bola kod pasa i mačaka ovaj lek se može primeniti p.o. u dozi od 0,5-1 mg/kg na 8h (za pse) i u dozi od 2,5-5 mg/kg na 12h (za mačke) (Duncan i Lascelles, 2007).

Glukokortikoidi / *Glucocorticoids*

Prednizolon je steroidni antiinflamatorni lek koji deluje i analgetički na bol slabog do umerenog intenziteta. Smanjuje zapaljenje i otok, pa bolju analgetičku efikasnost ispoljava kod karcinoma udruženih sa inflamacijom, kao i kod malignih oboljenja CNS i perifernih nerava. Prednizolon se u ove svrhe psima aplikuje p.o. u dozi od 0,25-1 mg/kg na 12-24h, tokom 14 dana, a zatim u istoj dozi

na 48h. Mačkama se ovaj lek daje p.o. u dozi od 0,25-0,5 mg/kg na 48h. Duža primena prednizolona prouzrokuje promene u ponašanju pacijenta (euforiju). Prednizolon se ne primenjuje zajedno sa NSAID (Brearley i Brearley, 2001; Duncan i Lascelles, 2007).

Glukozamin je prirodno jedinjenje koje se dobija iz hitina (polimera), osnovnog sastojka ljuštura morskih ljuskara. **Hondroitin** vodi poreklo iz hrskavice morskih pasa, krava i svinja. Opisani aktivni principi su dodaci ishrani, koji poseduju umereno antiinflamatorno i analgetičko dejstvo. Kod pasa se primenjuju u dozi od 13-15 mg/kg (računato prema hondroitin sulfatu) na 24h, a kod mačaka p.o. u dozi od 15 mg/kg na 12-24h. Preporučuje se kombinovana primena ovih dodataka ishrani sa NSAID i drugim analgeticima (Duncan i Lascelles, 2007).

Umesto zaključka / *Instead of a conclusion*

Onkologija u veterinarskoj medicini predstavlja noviju naučnu disciplinu, koja se razvila zahvaljujući želji i potrebi vlasnika za lečenjem njihovih ljubimaca i želji da se izbegne eutanazija obolelih od ove teške bolesti. Produžetak životnog veka pasa i mačaka sa kancerom nametnulo je potrebu za proučavanjem terapije bola kod ovih pacijenata. Rezultat toga je da se za kontrolu kancerskog bola danas koristi veći broj lekova iz različitih farmakodinamskih grupa. Neki od njih su registrovani za upotrebu u veterinarskoj medicini, a neki se preuzimaju iz palete lekova namenjenih za primenu kod ljudi.

Literatura / *References*

1. Baron JA. Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer. *Prog Exp Tumor Res* 2003; 37: 1-24.
2. Brearley CJ, Brearley JM. Chronic pain in animals. In: Flecknell AP, Waterman-Pearson A editors. *Pain Management in Animals*. 2th ed. London: WB Saunders, 2001; 147-60.
3. Compendium of Data Sheets, NOAH – National Office of Animal Health, 2009, UK.
4. Ćupić V, Muminović M, Kobal S, Velev R. *Farmakologija za studente veterinarske medicine*. Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 2007.
5. de M Souza CH, Toledo-Pize E, Amorin R, Barboza A, Tobias KM. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J* 2009; 50(5): 506-10.
6. Duncan B, Lascelles X. Supportive care for the Cancer Patients. In: Withrow JS and Vail MD editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. London: Saunders-Elsevier, 2007: 291-304.
7. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dog with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med* 2008; 22(6): 1373-9.
8. Greene SN, Lucroy MD, Greenberg CB, Bonney PL, Knapp DW. Evaluation of cisplatin administered with piroxicam in dog with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231(7): 1056-60.

9. Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* 2005; 21(8): 1217-26.
10. Jezdimirović M. Veterinarska farmakologija. IV dopunjeno izdanje. Beograd: Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2010.
11. Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW. Expression of COX-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 2001; 38(1): 116-9.
12. Knottenbelt C, Mellor D, Nixon C, Thompson H, Argyle DJ. Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumours. *J Small Anim Pract* 2006; 47(4): 196-200.
13. Koki A, Khan NK, Woerner BM *et al.* Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol* 2002; 507: 177-84.
14. Lavallo GE, Bertagnolli AC, Tavares WL, Cassali GD. COX-2 expression in canine mammary carcinoma. correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol* 2009; 46(6): 1275-80.
15. Raegg C, Dormon O. Suppression of tumor angiogenesis by nonsteroidal antiinflammatory drugs: a new function for old drugs. *Sci World J* 2001; 1: 808-11.
16. Rang PH, Dale MM, Ritter MJ, Moore KP, Lamb P. Farmakologija. 5th ed. – prevod, prvo srpsko izdanje, 2005, Novi Sad, Srbija: Data Status, 2003.
17. Robertson SA, Taylor PM. Pain management in cats – past, present and future. Part 2. Treatment of pain clinical pharmacology. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 321-33.
18. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibell L, Diederich M. The role of COX-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol* 2010.
19. Tennis MA, Vanscoyk M, Keith RL, Winn RA. The role of prostacycline in lung cancer. *Transl Res* 2010; 155(2): 57-61.
20. Vučković S, Prostran M, Todorović Z. Neoploidni analgetici. U knjizi: Bošnjak S, Beleslin D, Vučković-Denić Lj (ur). Farmakoterapija kancerskog bola. Beograd: Akademija medicinskih nauka, Srpskog lekarskog društva, 2007: 79-93.

ENGLISH

PHARMACOTHERAPY OF CANCER PAIN IN DOGS AND CATS SUFFERING FROM CANCER

Mirjana Milovanović, M. Jovanović, Sonja Vučković, Milica Prostran

Pain is an important symptom that accompanies cancer disease. Cancer pain is a chronic pain of medium to strong intensity, and it usually seriously impairs the quality of life of the cancer patients. In dogs and cats, the management of cancer pain includes drugs from different pharmacological groups. They are non-opioid and opioid analgesics, NMDA antagonists, anticonvulsant drugs, tricyclic antidepressants and steroids. Some of them are registered for use in veterinary medicine, and some are drugs for use in human medicine.

Key words: analgesics, pain, cancer, cats, dogs

ФАРМАКОТЕРАПИЯ КАНЦЕРНОЙ БОЛИ У СОБАК И КОШЕК

Миряна Милованович, М. Йованович, Соня Вучкович, Милица Простран

В патогенезе канцерной болезни значительное место занимает боль, как сопровождающий симптом этого тяжёлого патологического состояния. Боль, сопровождающая канцерную болезнь хронического течения и средней до сильной интенсивности, так, что серьёзно нарушает качество жизни пациентов, болеющих канцером. Терапия канцерной боли у собак и кошек проводится применением лекарств из различных фармакологических групп. Это прежде всего неопиоидные и опиоидные анальгетики, антагонисты НМДА рецепторов, антиконвульсивные лекарства, трициклические антидепрессивы и стероидные антиинфламаторные лекарства. Некоторые лекарства зарегистрированы для употребления в ветеринарной медицине, а некоторые перенимаются из палитры лекарств, назначенных для применения в гуманной медицине.

Ключевые слова: анальгетики, боль, карцинома, кошки, собаки

**REZISTENCIJA BAKTERIJA NA HINOLONE I NJEN UTICAJ
NA ZDRAVLJE LJUDI I ŽIVOTINJA******MECHANISMS OF QUINOLONE RESISTANCE AND IMPLICATIONS
FOR HUMAN AND ANIMAL HEALTH***

Maja Velhner, Gordana Kozoderović, Zora Jelesić, I. Stojanov, R. Ratajac,
Dragica Stojanović**

Široka upotreba antimikrobnih lekova iz grupe hinolona u humano i veterinarskoj medicini uslovlila je razvoj rezistencije kod bakterija, a time i probleme u lečenju, posebno komplikovanih infekcija ljudi. Rezistencija na hinolone se razvija usled mutacija na hromozomima, ali se može i preneti putem plazmida. Ciljni enzim gram-negativnih bakterija na koji deluju ovi lekovi naziva se giraza A, dok je ciljni enzim gram-pozitivnih bakterija uglavnom topoizomeraza IV. Giraza A je enzim koji se sastoji od dve subjedinice koje kodiraju geni gyrA i gyrB. Funkcija ovog enzima je regulisanje negativno orijentisanih navoja na DNK, te je neophodan za replikaciju bakterija. Kod bakterija kod kojih su ustanovljene tačkaste mutacije na 83 i/ili 87 kodonu gyrA gena razvija se rezistencija na hinolone, čiji se nivo određuje procentom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Nedavno je dokazano da se rezistencija na hinolone može preneti i putem plazmida PMQR (plasmid mediated quinolone resistance). Ciljni gen na plazmidu je qnr gen, koji kodira protein sa pentapeptidnim ponovcima koji formiraju naborane beta ploče neophodne za interakcije proteina. Qnr protein se vezuje za girazu i štiti je od inhibitornog efekta ciprofloksacina. Distribucija qnr dirgovane rezistencije je veća kod ljudi nego kod životinja. Ipak, kod živine je ovaj tip rezistencije dokazan češće nego kod drugih vrsta životinja koje se uzgajaju za ishranu ljudi. Plazmidima prenosiva rezistencija doprinosi bržem širenju rezistencije na hinolone. Ispravno rukovanje namirnicama može u znatnoj meri doprineti smanjenju rizika od infekcija kojima su izloženi ljudi. U laboratorijama humane i veterinarske medicine, neophodno je pratiti osetljivost bakterija na antimik-

* Rad primljen za štampu 20. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Maja Velhner, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad; mr sci. Gordana Kozoderović, dipl. biolog, dr sci. med. Zora Jelesić, vanredni profesor, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, R Srbija; dr sci. med. vet. Igor Stojanov, mr sci. med. vet. Radomir Ratajac, dr sci. med. vet. Dragica Stojanović, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, R Srbija

robne lekove, ne samo kod kliničkih izolata, već i vrsta izolovanih iz životne sredine. Kako je u više navrata dokazano da je upotreba antimikrobnih lekova u direktnoj korelaciji sa pojavom rezistencije bakterija na ove lekove, savetuje se ograničena i strogo kontrolisana primena antimikrobnih lekova, kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini.

Ključne reči: hinoloni, rezistencija, GyrA, QRDR, PMQR, qnr, MIC

Uvod / Introduction

Rezistencija na antimikrobne lekove je jedna od veoma važnih osobina koje bakterije poseduju. Klinički značajna rezistencija, koja je ustanovljena kod skoro svih vrsta bakterija, obično se povezuje sa načinom primene lekova u humanoj i veterinarskoj medicini. Rezistencija može biti prirodna ili stečena (Li, 2005). Geni za rezistenciju se mogu naći na hromozomima i na mobilnim genetičkim elementima kao što su plazmidi. Primena hinolonskih preparata, od početka šezdesetih godina do danas, uslovljava pojavu rezistencije i na ovu grupu lekova. Zbog toga se savetuje stroga kontrola primene lekova, kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini. U ovom radu su opisani najvažniji mehanizmi razvoja rezistencije bakterija na hinolone i fluorhinolone, kao i mogućnost da se ove bakterije nađu u namirnicama i uzrokuju infekcije kod ljudi.

Hinolonski antimikrobni lekovi su u upotrebi od 1962. godine i imaju široku primenu u humanoj i veterinarskoj medicini. U početku su se koristili u terapiji infekcija izazvanih gram-negativnim bakterijama, ali zahvaljujući novim generacijama lekova, nalaze primenu i u terapiji bolesti koje su izazvane i gram-pozitivnim bakterijama. Rezistencija bakterija na hinolone koja se tokom godina razvila, predstavlja ozbiljan problem u primeni ove grupe lekova. Rezistencija bakterija može biti prirodna ili stečena. Stečena rezistencija bakterija nastaje uglavnom zbog mutacija na hromozomu ili mehanizma aktivnog efluksa. Poznato je naime da inaktivacija efluks pumpe kod nekih bakterija pojačava osetljivost na hinolonske lekove (Li, 2005). Aktivan efluks u sadejstvu sa drugim determinantama rezistencije odgovoran je za multiplu rezistenciju kod mnogih vrsta bakterija.

Mehanizmi razvoja rezistencije i načini širenja rezistentnih bakterija / Resistance mechanisms and spread of resistant bacteria

Ciljni molekuli za dejstvo hinolona su enzimi koji katalizuju replikaciju DNK bakterijske ćelije. Uloga važnih enzima za replikaciju bakterijske ćelije opisuje se na sledeći način. Topoizomerase regulišu povezivanje i razvezivanje DNK prstenova i duplog lanca DNK. Takođe, enzimi iz ove grupe uzrokuju kratkotrajne prekide na DNK i odgovorni su za ponovno povezivanje krajeva razdvojenih lanaca. Topoizomeraza IV se sastoji od dve subjedinice – ParC i ParE, i ima ulogu da ispravlja navoje DNK bakterija. Ova reakcija zavisi od adenozin tri-

fosfata (ATP) i odigrava se sporije od procesa razvezivanja. Sa druge strane, giraza koja sadrži takođe dve subjedinice (GyrA i GyrB), uvodi negativne navoje u linearni dupleks DNK na takav način da lanac DNK obmotava enzim i uvrće se celom dužinom oko njega. Kada tokom replikacije dođe do odmotavanja lanca DNK, uklanjaju se negativni navoji i tek delovanjem giraza enzima sa ovog mesta replikacija se nastavlja (Drlica i Zhao, 1997; Levine i sar., 1998). Remeteći funkciju ovih bakterijskih enzima hinoloni blokiraju DNK sintezu. Topoizomeraza IV je ciljni molekul za antibakterijsko dejstvo fluorohinolona, ciprofloksacina na *S. aureus*, ali i na druge gram-pozitivne bakterije (Drlica i Zhao, 1997). Za gram-negativne bakterije ciljni molekul je giraza te ukoliko dođe do stvaranja kompleksa hinoloni-giraza i DNK biće blokirana replikacija ispred replikacione viljuške i samim tim bakterijska ćelija odumire (Drlica i Zhao, 1997). Razvoj rezistencije gram-negativnih bakterija na hinolone najčešće je izazvan mutacijom na *gyrA* genu. Smanjenje osetljivosti na pojedine lekove je povezano sa tačkastim mutacijama na regionu koji određuje rezistenciju na hinolone (Quinolone resistance – determining region, QRDR). U ovom delu hromozoma najčešće su mutacije na serinu 83 i asparaginskoj kiselini 87. Mutacija na serinu 83 sa nekom od hidrofobnih aminokiselina će povećati nivo rezistencije, a dvostruke mutacije na oba kodona (83 i 87) će ga udvostručiti i utrostručiti. Mutacije na Par C proteinu takođe mogu sniziti osetljivost na ciprofloksacin koja, ukoliko je udružena sa mutacijom za koju je odgovoran gen *gyrA*, može pojačati rezistenciju na hinolone. Najviši nivo rezistencije se razvija ukoliko postoje po dve tačkaste mutacije na oba gena, *gyrA* i *parC* (Drlica i Zhao, 1997). Nivo rezistencije na antibakterijske lekove se određuje preko minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Bakterije se smatraju osetljivim na ciprofloksacin ukoliko je $MIC \leq 1 \mu\text{g/ml}$, a rezistentnim ukoliko je $MIC > 4 \mu\text{g/ml}$. U literaturi postoji puno podataka o epidemiološkoj povezanosti izolata iz namirnica animalnog porekla i izolata poreklom od ljudi, što ukazuje na mogućnost prenošenja rezistentnih bakterija sa životinja na ljude. Postoji veliki broj literaturnih podataka o Gyr A rezistenciji kod gram-negativnih bakterija. U ovom radu iznosimo rezultate istraživanja koji ukazuju na mogućnost prenošenja ovih bakterija na ljude preko namirnica i životinja.

Sianglum i sar. (2007) su ustanovili slične tipove rezistencije kod sojeva *Escherichiae coli* izolovanih iz uzoraka fecesa ljudi i njihovih kućnih ljubimaca. Takođe autori su na osnovu DNK analize i sekvenci *gyrA* gena ustanovili povezanost među bakterijskim izolatima. Ustanovljena je rezistencija na nalidiksinsku kiselinu (NAL) kod 31,6% sojeva *E.coli* izolovanih kod ljudi i 32,4% izolata poreklom od kućnih ljubimaca. Isti tip rezistencije utvrđen je kod 35,6% sojeva izolovanih iz uzoraka povrća i 57,1% sojeva izolovanih iz sladoleda, što ukazuje na mogućnosti prenošenja ovih bakterija putem namirnica na ljude. Sedmogođšnjim istraživanjem tim istraživača iz Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, USA) je ustanovio da je u grupi netifoidnih salmonela najveći porast broja rezistentnih izolata na hinolone bio kod *Salmonella Enteritidis* i *Salmonella Typhimurium*. Kod 27 izolata iz ove kolekcije sojeva ustanovljena je i rezistencija na

β -laktame proširenog spektra i hinolone (Whichard i sar., 2007). Smatra se da su vrste iz roda *Campylobacter* u najvećoj meri doprinele širenju rezistencije na hinolonske lekove. Naime, ove bakterije u kontaktu sa hinolonima veoma brzo ispoljavaju fenotipsku rezistenciju. Kod ovih kao i kod ostalih gram-negativnih bakterija, tačkaste mutacije na *gyrA* genu, i to najčešće treonin 86 u izoleucinu uzrokovala su povišen nivo rezistencije na ove lekove. Pri tome je MIC ciprofloksacina $>16 \mu\text{g/ml}$, dok su mutacije asparaginske kiseline na kodonu 90 u asparaginu i treoninu na kodonu 86 u lizinu, pratile vrednosti MIC ciprofloksacina od 6 do $16 \mu\text{g/ml}$. Zajedničkim delovanjem efluks pumpe CmeABC i mutacije na *gyrA* genu, MIC ciprofloksacina može biti veći od $32 \mu\text{g/ml}$ (Zhang i sar., 2003). *C. jejuni* i *C. coli* su stalni deo mikrobioma digestivnog sistema životinja. Tokom procesa klanja meso se često kontaminira sadržajem iz digestivnog sistema. Ovako kontaminirano meso može uzrokovati infekcije kod ljudi. Kako se u praksi živina često leči hinolonskim lekovima, u kontaktu sa lekom vrši se selekcija rezistentnih sojeva kampilobakterija za koje je dokazano da mogu opstati sve do kraja proizvodnog ciklusa. Smatra se da antibiotici eliminišu sojeve osetljive na lek, pri čemu u digestivnom sistemu tom prilikom nema kompeticije sa crevnim bakterijama, i vremenom rezistentne bakterije postaju dominantne (Zhang i sar., 2003). Istraživanjem u Švedskoj je ustanovljeno da su za nastanak infekcije *Campylobacter* vrstama najveći faktori rizika za ljude, konzumiranje nepasterizovanog mleka i živinskog i svinjskog mesa pripremljenog na roštilju. Takođe je utvrđen i značaj kontakta ljudi sa živinom koji su zaposleni na farmama kod kojih se *Campylobacter* često izoluje (Studahl i sar., 2000). Međutim, mutacije na hromozomima i pojačano delovanje efluks pumpe nisu jedini mehanizmi rezistencije koji se često aktiviraju u sadejstvu sa plazmidski dirigovanom rezistencijom. Prvi put je ovaj mehanizam razvoja rezistencije opisan kod kliničkog izolata *Klebsiella pneumoniae*, od strane Martinez-Martinez i sar. (1998). Autori su ustanovili da transkonjuganti imaju višestruko povećanu rezistenciju na hinolone. Višestruko povećana rezistencija je zabeležena kod sojeva koji imaju pMG252 plazmid u odnosu na sojeve bez plazmida, poput *E. coli* J53. Protein Qnr na ovom plazmidu kodira *qnr* gen. Protein se sastoji od 218 aminokiselina i ima strukturu pentapeptidnih ponovaka koji formiraju naborane β -ploče odgovorne za interakcije proteina. U prečišćenom stanju Qnr protein štiti *E. coli* od inhibitornog delovanja ciprofloksacina, pri čemu je koncentracija Qnr proteina u direktnoj proporciji sa stepenom osetljivosti na hinolone. Pored toga što kodira Qnr protein, plazmid pMG252 takođe kodira i determinante za rezistenciju na druge antimikrobne lekove (Li i sar., 2005) (tabela 1).

Tabela 1. Geni za rezistenciju na plazmidu pMG252 i njihova funkcija /
Table 1. Resistance genes on plasmid pMG252 and their function

Naziv gena za rezistenciju / Name of resistance gene	Funkcija gena / Gene function
aac geni / <i>aac genes</i>	Kodiraju acetiltransferazu odgovornu za rezistenciju na aminoglikozide / <i>Code acetyltransferase responsible for resistance to aminoglycosides</i>
bla geni (AmpC, FOX5, DHA-1, OXA-30, SHV-7 β -laktamaze) / <i>bla genes (AmpC, FOX5, DHA-1, OXA-30, SHV-7 β-lactamase)</i>	Odgovorni su za rezistenciju na β -laktame / <i>Responsible for resistance to β-lactam antibiotics</i>
cat geni / <i>cat genes</i>	Odgovorni za rezistenciju na hloramfenikol / <i>Responsible for resistance to chloramphenicol</i>
qacE1 / <i>qacE1</i>	Regulišu efluks pumpu / <i>Regulate efflux pump</i>
sulI geni / <i>sulI genes</i>	Kodiraju dihidropteroate koji su odgovorni za rezistenciju na sulfonamide / <i>Code dihydropteroate which are responsible for resistance to sulphonamides</i>

Plazmidski prenosiva rezistencija je registrovana kod kliničkih izolata *E. coli* u nekoliko bolnica u Kini, gde je od 1993. godine utvrđen porast rezistencija (>50%) na fluorohinolone. Naime, u ovoj zemlji je, prema navodima iz literature, najveći procenat rezistencije bakterija na antibakterijske lekove uzrokovan njihovom velikom i nepravilnom upotrebom (Li i sar., 2005). Smanjena osetljivost na cefalosporine je rasprostranjena u Indiji. Bolnički izolati *Salmonella enterica* serovar *Thyphi* sa značajnom rezistencijom često se nalaze u bolnicama u Africi i Aziji (Parry i Threlfall 2008). Kako navode Li i sar. (2005), plazmidski prenosiva rezistencija na hinolone ustanovljena je i u Egiptu, Japanu i Evropi. Proizilazi da plazmidi koji su nosioci rezistencije bakterija doprinose njihovom uspešnijem opstajanju u raznim ekološkim nišama. Smatra se da je plazmid doprineo širenju rezistencije na hinolone u raznim regionima u svetu, što je, kao i kod drugih antimikrobnih lekova, u direktnoj srazmeri sa upotrebom antibiotika kod ljudi i životinja. Empirijska upotreba hionolona je nesumnjivo dodatno doprinela širenju rezistencije bakterija na ove lekove (Li, 2005). U Engleskoj je registrovana rezistenciji *Salmonella* vrsta na hinolone. Kod ovih bakterija je dokazan novi gen rezistencije na hinolone (*qnr*), što je praćeno povećanim vrednostima MIC ciprofloksacina, koje su iznosile od 0,125 μ g/ml do 1,0 μ g/ml, a osetljivost na nalidiksinsku kiselinu sa vrednosti MIC <16 μ g/ml. Sojevi salmonela sa *qnr* genom koji su izolovani u Engleskoj, povezivani su sa Dalekim istokom i uvozom hrane sa Tajlanda (Hopkins i sar., 2008). Izveštaji iz Danske ukazuju na pojavu plazmidom prenosive multiple rezistencije *E. coli* kod dva bolnički lečena pacijenta. Jedan izolat *E. coli* je posedovao gen *qnrA*, a drugi gen *qnrS* i oba su bila osetljiva na ciprofloksacin; mutacije na topoizomerazama nisu ustanovljene (Cavaco i sar., 2007). Gen *qnrS* je ustanovljen kod 23 soja *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* izolovanih u Danskoj i Tajlandu. Svi izolati su imali povećani MIC ciprofloksacina >0,06 μ g/ml, dok

je osetljivost na NAL iznosila 8 – 16 µg/ml. Mutacije na genu *gyrA* nisu ustanovljene, što navodi na činjenicu da povećan MIC ciprofloksacina može biti dirigovan isključivo plazmidom (Cavaco i sar., 2007b). Istraživanja iz Velike Britanije takođe upućuju na čestu pojavu uvoza rezistentnih bakterija preko ljudi koji su putovali u Egipat, Indiju, Maleziju, Maroko i Tajland (Hopkins i sar., 2008). Protekle dekadu obeležila je i pojava soja *Salmonella Typhimurium* DT104 (STDT104) sa višestrukom rezistencijom na ampicilin, hloramfenikol, streptomycin, sulfonamide i tertraciklin. Geni odgovorni za višestruku rezistenciju su upakovani zajedno u ostrvo genoma oznake SGI1 koje je integrisano u hromozom, što je doprinelo interkontinentalnom širenju STDT104 (Boerlin i Reid-Smith, 2008). Epidemiološka istraživanja su ukazala na klonalno širenje *S. Typhimurium* DT104 iz hrane na ljude, koji su zbog alimentarne infekcije lečeni u jednoj bolnici u Engleskoj. Od ukupno 27 pacijenata, pet je lečeno samo ciprofloksacinom ili u kombinaciji sa drugim antimikrobnim lekovima. Kod dva pacijenta, od kojih je jedan lečen ciprofloksacinom, a drugi fleroxacinom, kao i kod šest pacijenata koji nisu bili tretirani ovim lekovima, dokazana je epidemiološka povezanost *S. Typhimurium* DT104 sa uzorcima iz lokalne klanice svinjskog mesa (Molbak i sar., 1999).

Zaključak / Conclusion

Rezistencija bakterija na antimikrobne lekove, bez obzira na to da li je reč o horizontalnom ili vertikalnom prenošenju, ima ozbiljne posledice po zdravlje ljudi. U populaciji ljudi naročito su ugrožena deca, osobe starije životne dobi, kao i odrasle osobe kod kojih je imunološki sistem oslabljen usled postojanja neke druge primarne bolesti. Iz tih razloga je neophodan monitoring rezistencije na antimikrobne lekove i kod kliničkih izolata i kod bakterija izolovanih iz namirnica. Neophodna je pravilna upotreba antimikrobnih preparata kao važnog faktora u limitiranju pojave rezistencije. Na industrijskim farmama za uzgoj pilića je mnogo teže održavati adekvatnu koncentraciju leka u sistemima za napajanje i hranu tako da je verovatnoća da jedinke neće dobiti adekvatnu dozu leka mnogo veća. Posledica toga je razvoj rezistencije na hinolone i druge antimikrobne lekove. Zato se i u stočarskoj proizvodnji želi da se maksimalno smanji upotreba lekova u preventivne svrhe, a u terapijske samo ukoliko je to neophodno. Upotreba hinolonskih preparata se ne preporučuje ni u brojerskoj proizvodnji posle treće nedelje, zbog povećanog rizika od pojave sojeva *Campylobacter* vrsta, rezistentnih na ovu grupu antimikrobnih lekova. Svetska zdravstvena organizacija i Centar za kontrolu bolesti (CDC) ukazuju na to da pored influence, zdravlje ljudi jednako ili više ugrožavaju alimentarne infekcije. Kako se iz najrazvijenijih zemalja često izveštava o pojavi infekcija sa rezistentnim sojevima bakterija, koje su usledile posle putovanja na druge kontinente, izvesna je mogućnost "uvoza" bakterija naoružanih mehanizmima za razvoj rezistencije. Uporne bolničke infekcije su takođe u vrhu mogućih rizičnih epidemija. Konačno, klonalno širenje multirezistentnih

bakterija sa životinja i namirnica na ljude, ukazuje na težinu problema sa kojima se suočavamo u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog navedenih razloga neophodna je u bakteriološkim laboratorijama primena testova za ispitivanje osetljivosti, odnosno rezistencije bakterija na antimikrobne lekove, kao i primene molekularanih testova radi analize mehanizama i načina širenja rezistentnog fenotipa bakterija.

Literatura / References

1. Boerlin P, Reid-Smith RJ. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim Health Res Rev* 2008; 9(2): 115-26.
2. Cavaco LM, Hansen DS, Fris-Moller A, Aarstrup FM, Hasman N, Frimodt-Moller N. First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (qnrA and qnrS) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. *J Antimicrob Chemoth* 2007a; 59: 804-5.
3. Cavaco LM, Hendriksen RS, Aarstrup FM. Plasmid mediated quinolone resistance determinant qnrS1 detected in *Salmonella enterica* serovar Corvallis strains isolated in Denmark and Thailand. *J Antimicrob Chemoth* 2007b; 60:704-6.
4. Drlica K, Zhao X. DNA Gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiology and Mol Biol Rev* 1997; 61(3): 377-92.
5. Hopkins K, Day M, Threlfall EJ. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(2): 340-342.
6. Levine C, Hiasa H, Mariani KJ. DNK gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 29-43.
7. Li Xian-Zhi. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J of Antimicrob Ag* 2005; 25: 453-63.
8. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9.
9. Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, Ebbesen JM, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smith P, Petersen AM, Wegener HC. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone resistant *Salmonella enterica* serotype thyphimurium DT104. *The New Engl J of Med* 1999; 34(4): 1420-5.
10. Parry CM, Threlfall EJ. Antimicrobial resistance and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 531-8.
11. Sianglum W, Wonglumsom W, Srimanote P, Kittiniyom K: Analysis of gyrA mutations related to quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates originating from pet, human, vegetable and ice in Bangkok and vicinity. *Southeast-Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38(6): 1095-100.
12. Studahl A, Andersson Y. Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 269-75.
13. Whichard JM, Kathryn G, Stevenson JE, Joyce KJ, Cooper KL, Omondi M, Medalla F, Jacoby GA, Timothy BJ. Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(11): 1681-8.
14. Zhang Q, Lin J, Pereira S. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Anim Health Res Rev* 2003; 4(2): 63-71.

ENGLISH

MECHANISMS OF QUINOLONE RESISTANCE AND IMPLICATIONS FOR HUMAN AND ANIMAL HEALTH

Maja Velhner, Gordana Kozoderović, Zora Jelesić, I. Stojanov, R. Ratajac, Dragica Stojanović

Quinolone antibiotics have been widely used in human and veterinary medicine. This has caused the development of resistance and difficulties in the treatment of complicated bacterial infections in humans. The resistance to quinolones develops due to chromosome mutations and it can also be transferred by plasmids. The target enzyme for quinolones in Gram-negative bacteria is Gyrase A, while the target enzyme in Gram-positive bacteria is mostly topoisomerase IV. Gyrase A consists of two subunits encoded by genes *gyrA* and *gyrB*. The function of the enzyme is to introduce negative supercoiling in DNA and therefore is essential for the replication of bacteria. Quinolone resistance develops if point mutations at 83 and/or 87 codon are introduced on *gyrA*. Establishing a minimal inhibitory concentration (MIC) to this group of antimicrobials will reveal possible mutations. Recently it was discovered that quinolone resistance is transmittable by plasmid termed PMQR (plasmid mediated quinolone resistance). The target gene marked *qnr* encodes a pentapeptide repeat family protein. Pentapeptide repeats form β sheets, involved in protein-protein interactions. Qnr protein binds to Gyrase A protecting the enzyme from the inhibitory effect of ciprofloxacin. The distribution of *qnr* related resistance is higher in humans than in animals. In poultry, however, this type of resistance is present more than in other animals. Plasmid mediated resistance contributes to the faster spread of quinolone resistance. Proper food handling will significantly contribute to decreasing the risk from infection to which people are exposed. In medical and veterinary laboratories antimicrobial resistance monitoring in clinical and environmental isolates is advised. Since correlation between antibiotics application and antimicrobial resistance is often suggested, antimicrobial use must be under strict control of the authorities both in human and in veterinary medicine.

Key words: quinolone, resistance, GyrA, QRDR, PMQR, qnr, MIC

РУССКИЙ

МЕХАНИЗМЫ СОПРОТИВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ НА ХИНОЛОНЫ И ВЛИЯНИЕ НА ЗДОРОВЬЕ ЛЮДЕЙ И ЖИВОТНЫХ

Мая Велхнер, Гордана Козодерович, Зора Елесич, И. Стоянов, Р. Ратаяц, Драгица Стоянович

Широкое употребление антибиотиков из группы хинолонов в гуманной и ветеринарной медицине, обусловило развитие супротивления у бактерий, а тем и проблемы в лечении, отдельно осложнённых инфекций людей. Сопротивление на хинолоны возникает благодаря мутациям на хромосомах, а также это супротивление переносное путём плазмидов. Целевой энзим у грамм отрицательных бактерий на который действуют эти антибиотики, называется гираза А, пока целевой энзим у

грамм положительных бактерий главным образом топоизомеразы IV. Гираза А энзим, состоящий из двух подединиц, кодирующие гены *girA* и *girB*. Функция этого энзима регулировать отрицательно ориентированные изгибы на ДНК, то необходим для репликации бактерий. У бактерий у которых установлены точечные мутации на 83 и/или 87 кодоне гена *girA* развивается сопротивление на хинолоны, что можно установить утверждением минимальной ингибиторной концентрации (МИК). Недавно доказано, что сопротивление на хинолоны можно перенести и путём плазмидов ПМХР (*plasmid mediate quinoline resistance*). Целевой ген на плазмиде обозначен *hnr* и кодирует протеин с пентапептидными второгодиками, формирующие складчатые бета плиты необходимые для интеракции протеинов. *Хнр* протеин связывается для Гиразы и защищает от ингибиторного эффекта ципрофлоксацина. Дистрибуция *хнр* дирижированного сопротивления более большая у людей, чем у животных. Однако, у домашних птиц этот тип сопротивления доказан чаще, чем у других видов животных, выращиваемые для питания людей. Плазмидами переносное сопротивление содействует более быстрому расширению сопротивления на хинолоны. Исправное управление пищевыми продуктами может в значительной мере содействовать, что риски от инфекций, которыми выставлены люди значительно меньше. В лабораториях гуманной и ветеринарной медицины, необходимо следить чувствительность бактерий к антимикробным препаратам, не только у клинических изолятов, уже и видов, изолированных из среды обитания. Как часто доказано, что употребление антибиотиков в прямой корреляции с явлением сопротивления бактерий к антибиотикам, советуется ограниченное и строгое контролируемое применение антимикробных лекарств, как в ветеринарной, так и в гуманной медицине.

Ключевые слова: хинолон, сопротивление, *girA*, ХРДР, ПМХР, *хнр*, МИК

MOGUĆNOSTI PRIMENE FARMAKOLOŠKOG STRES TESTA U FUNKCIONALNOM ISPITIVANJU SRCA KOD PASA* *POSSIBILITIES OF APPLYING PHARMACOLOGICAL STRESS TESTING IN ASSESSMENT OF HEART FUNCTIONAL CAPACITY IN DOGS*

Ljubica Spasojević Kosić, D. R. Trailović**

Sistolna i dijastolna srčana funkcija, procenjene ehokardiografski, ne odražavaju funkcionalni kapacitet pacijenta, niti mogu da objasne pojavu simptoma pri određenom stepenu aktivnosti. Procena funkcionalnog kapaciteta je sastavni deo kardioloških pregleda u humanoj medicini. Funkcionalno ispitivanje srca može da se sprovede testom opterećenja ili farmakološki. Dosadašnja istraživanja u kardiologiji pasa nisu doprinela kliničkoj upotrebi funkcionalnog ispitivanja srca kod pasa. Farmakološki stres test je optimalan način funkcionalnog ispitivanja srca kod pasa. Budući da podražava efekte umerene fizičke aktivnosti, dobutamin je predložen kao lek izbora za izazivanje farmakološkog stres testa. U ovom radu su dati pregledi rezultata najznačajnijih istraživanja, kao i naših istraživanja primene dobutamin stres testa (DST) kod pasa, sagledani su nedostaci dosadašnjih istraživanja i ukazano je na buduće pravce istraživanja DST.

Ključne reči: funkcionalno ispitivanje srca, dobutamin stres test, pas

Funkcionalno ispitivanje srca / *Functional heart examination*

Fundamentalni zahtev za mnoge aktivnosti svakodnevnog života je sposobnost da se izvede pretežno aerobni rad, rad koji zahteva integrativne aktivnosti srca, pluća i cirkulacije da isporuče kiseonik metabolički aktivnoj mišićnoj masi. Kod kardiovaskularnih pacijenata ehokardiografski nalazi u mirovanju, kao što su sistolna i dijastolna dimenzija leve komore, zapravo ne odražavaju pacijenatov funkcionalni status ili simptome koji se pojavljuju kod pacijenta pri određenom stepenu aktivnosti. Merenje funkcionalnog kapaciteta predstavlja vredno sred-

* Rad primljen za štampu 14. 04. 2010. godine

** Dr sci. med. vet. Ljubica Spasojević Kosić, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; dr sci. med. vet. Dragiša R. Trailović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

stvo za dijagnozu, procenu terapije i prognoze u najrazličitijim slučajevima. Specifični aspekti testiranja, kao što su način vežbanja i protokol ispitivanja, krajnja tačka testiranja, analiza respiratornih gasova, su visoko zavisne od populacije koja se testira i razloga upućivanja pacijenta na procenu funkcionalne sposobnosti. Bez obzira na navedene specifičnosti i uprkos znatnom napretku u imidžing dijagnostici, procena funkcionalnog kapaciteta ostaje značajna procedura kontrole određenih patoloških stanja kardiovaskularnog sistema u humanoj medicini (Fleg i sar., 2000).

Kardiolozi u humanoj medicini koriste funkcionalno ispitivanje srca u dijagnostici ishemije miokarda, oboljenja valvula, kardiomiopatije, koronarne arterijske bolesti (CAD), srčane insuficijencije, periferne arterijske bolesti, pejsmejke, kongenitalnih srčanih oboljenja. Kod ljudi se test opterećenja srca (ergometrija) sprovodi korišćenjem pokretne trake ili bicikla, ili se izvodi farmakološki, intravenskom infuzijom dobutamina, arbutamina, dipiridamola ili adenoza (Fleg i sar., 2000; Gulati i sar., 2005; Wackers, 1993; Kim i sar., 2004; Thomas i Miyamoto, 2004; Lavie i sar., 2004).

Farmakološki stres test / *Pharmacological stress test*

Farmakološki stres ne može kompletno da zameni fizičko opterećenje i treba da se razmatra kao zamena ili drugi izbor za pacijente kod kojih se očekuje da je fizičko opterećenje neadekvatno, kao što su to pacijenti sa ortopedskim, neurološkim, perifernim vaskularnim i drugim problemima (Wackers, 1993). Drugi razlog razvoja procedura farmakološkog stres testiranja nalazimo u činjenici da je tokom izvođenja pokreta pacijenta na ergobiciklu ili pokretnoj traci otežana upotreba i sprovođenje ehokardiografskih pregleda (Freeman i sar., 1984; Manering i sar., 1988; Hoffmann i sar., 1993).

Farmakološki stres test se kod ljudi koristi da identifikuje supklinička srčana oboljenja kod pacijenata tretiranih doksorubicinom i kod talasemijskih pacijenata, u dijagnostici koronarne arterijske bolesti, zatim da se predvide perioperativna dešavanja, kao i dešavanja u postoperativnom oporavku posle vaskularne hirurgije. Farmakološki stres test je dobar nezavisan indikator prognoze i tolerancije vežbe pacijenata sa srčanim oboljenjem (McEntee i sar., 1996).

Korišćenje određenih agenasa za farmakološki stres test uslovljava upotrebu određene imidžing tehnike. Ovo je potpuno razumljivo ako se imaju u vidu različiti mehanizmi delovanja određenih lekova koji se koriste za farmakološki stres (Wackers, 1993).

Osobine i dejstvo dobutamina u DST kod pasa / *Characteristics and effect of dobutamine in DST in dogs*

Inicijalni korak u razvoju procedure farmakološkog stres testiranja kod pasa bilo je determinisanje srčanih performansi kod zdravih pasa tokom infuzije

dobutamina, pri čemu je doza dobutamina postepeno povećavana (McEntee i sar., 1996; 1998). Dobutamin je izabran jer je najčešće korišćeni lek u humanoj medicini za farmakološki stres test (Wackers, 1993). Štaviše, aplikovan intravenoskom infuzijom, dobutamin ispoljava svoje dejstvo odmah i može da se koristi sa relativnom sigurnošću, jer ima kratkotrajan efekat (Jewitt i sar., 1974). Dobutamin ispoljava visoku inotropnu efikasnost, niske hronotropne i vazopresorne efekte, kao i niska aritmogena svojstva (Tuttle i Mills, 1975). Terapijska doza dobutamina za prouzrokovanje pozitivnog inotropnog efekta kreće se od 2,5 do 20 $\mu\text{g/kg/min}$ (Bonagura i Kirk, 1995; Miller i Tilley, 1995).

Dobutamin je jak β_1 adrenergički agonista sa minimalnim β_2 i α adrenergičkim efektima (Tuttle i Mills, 1975; Sonnenblick i sar., 1979). Ispitivanja sprovedena na zdravim neanestetisanim psima (Vatner i sar., 1974; Hinds i Hawthorne, 1975; Liang i Hood, 1979) pokazala su da dobutamin povećava minutni volumen i kontraktilnost miokarda, da ima mali efekat na srčanu frekvenciju i aortni krvni pritisak, dok se ukupni periferni vaskularni otpor smanjuje. Kada se izvrši prethodna preganglijska blokada primenom mekamilamina, i srčana frekvencija i arterijski krvni pritisak se povećavaju pod dejstvom dobutamina, dok se periferni vaskularni otpor ne menja (Liang i Hood, 1979). Ovi rezultati sugerisu da dobutamin kod pasa poseduje značajno direktno hronotropno i inotropno dejstvo, a samo minimalni direktan vaskularni efekat. Međutim, u prisustvu intaktnog baroreceptornog refleksa, direktni hronotropni efekat dobutamina je poništen preko refleksnog usporavanja srčane frekvencije prouzrokovanog povišenjem sistolnog volumena i minutnog volumena. Takođe, dolazi do pojave refleksne vazodilatacije i smanjenja perifernog vaskularnog otpora (Liang i sar., 1981).

Primarno dejstvo dobutamina, koje je iskorišćeno u dijagnostičke svrhe, jeste povećanje srčane frekvencije i sistolnog krvnog pritiska, što direktno povećava potrebe miokarda za kiseonikom, slično dešavanjima tokom umerene fizičke aktivnosti.

Infuzija dobutamina od 2,5 do 42,5 $\mu\text{g/kg/min}$, aplikovana postepenim povećanjem doze svakih 5 minuta za po 5 $\mu\text{g/kg/min}$, dovodi do dvostrukog povećanja kapaciteta srčane pumpe kod svesnih zdravih pasa (McEntee i sar., 1996; 1998). Snaga minutnog volumena srca, definisana kao proizvod minutnog volumena srca i sistemskog arterijskog pritiska, predstavlja varijablu koja karakteriše globalnu srčanu performansu sa aspekta hemodinamike (Tan, 1987). Dostizanje maksimalne snage minutnog volumena srca (CPOmax) kod pasa pri infuziji dobutamina se javlja pri maksimalnom minutnom volumenu srca (COMax), zbog izostajanja značajne promene srednjeg sistemskog arterijskog pritiska. Pri inotropnoj stimulaciji sprovedenom infuzijom dobutaminom, visoke doze dobutamina od 27,5 do 50 $\mu\text{g/kg/min}$ indukuju značajno povećanje indeksa snage srca (CPI, cardiac power index), srčanog indeksa (CI, cardiac index), sistolnog indeksa (SI, stroke index), srčane frekvencije, kao i značajno smanjenje pulmonalnog vaskularnog otpora (PVR, pulmonary vascular resistance) i sistemskog vaskularnog otpora (SVR, systemic vascular resistance). Srčani indeks (CI) je pri-

marno odgovoran za ovakvo povećanje u CPI. Povećanje vrednosti srčanog indeksa (CI) se javlja uglavnom zbog povećanja u sistolnom volumenu, dok se ne dostigne maksimalna vrednost sistolnog volumena (SV max), a zatim je povećanje srčanog indeksa posledica povećanja i srčane frekvencije (HR) i sistolnog volumena (SV) (McEntee i sar., 1996). Sistolni indeks (SI) i srčana frekvencija (HR) doprinose aproksimativno 55% i 45% maksimalnom povećanju srčanog indeksa (CI) (McEntee i sar., 1996). Povećanje sistolnog indeksa (SI) je posledica smanjenja minimalnog indeksa volumena leve komore (Vlmin). Tokom infuzije dobutamina, maksimalni indeks volumena leve komore (Vlmax) i dijasolni pritisak leve komore (LVDP) se ne menjaju. Zbog toga, povećanje u sistolnim funkcijama leve komore tokom infuzije dobutamina kod pasa ne nastaje zbog povećanja punjenja srca (preload) (McEntee i sar., 1998).

Infuzija dobutamina pri postepenom povećanju doze kod zdravih pasa rase bigl indukuje značajne promene indeksa sistolne funkcije miokarda kao što su maksimalna frekvencija porasta pritiska u komorama (Max dP/dt), količnik maksimalne frekvencije rasta ventrikularnog pritiska sa razvijenim pritiskom ((max dP/dt)/DP), ejekciona frakcija (EF), srednja sistolna ejekciona frekvencija (SER), pre-ejekcioni period (PEP), ejekciono vreme leve komore (LVET), indeks ejekcionog vremena leve komore (LVETI), količnik PEP/LVET. Međutim, osetljivost ovih indeksa da detektuju promene u srčanoj kontraktilnosti je različita. Najosetljiviji indeksi za detekciju povećanja kontraktilnosti miokarda su: max dP/dt, (max dP/dt)/DP i srednja SER. Najmanje osetljivi indeksi za detekciju povećanja kontraktilnosti miokarda su EF, PEP i LVET, pri čemu ovi indeksi značajno koreliraju sa drugim indeksima. Najmanju osetljivost u detektovanju povećanja kontraktilnosti imaju LVETI i PEP/LVET i njihove vrednosti ne pokazuju značajnu korelaciju sa drugim merenim indeksima. Prednost indeksa ejekcione faze sastoji se u tome da one mogu da budu merene neinvazivno elektrokardiografijom ili ehokardiografijom (McEntee i sar., 1998). Korišćenjem invazivnih tehnika, kao najtačnijih i najosetljivijih u proceni kontraktilnosti miokarda, obezbeđene su kontrolne vrednosti sistolne funkcije miokarda tokom infuzije dobutamina kod zdravih svesnih pasa, koje mogu da posluže kao standard pri budućem ispitivanju osetljivosti neinvazivno merenih indeksa kontraktilnosti miokarda kod svesnih zdravih pasa i kod pasa obolelih od kardiomiopatije (McEntee i sar., 1998).

Aspekti kliničke primene DST kod pasa / *Aspects of clinical application of DST in dogs*

Kod pasa je, kao i kod ljudi, opisano postojanje delimičnog preklapanja bazalnih vrednosti srčanih performansi između zdravih pasa i pasa sa kardiomiopatijom (Calvert, 1992). Sa ove tačke gledišta, procena funkcije miokarda pasa podvrgnutih stres testiranju, a ne u mirovanju, predstavlja mnogo osetljiviju i specifičniju dijagnostičku tehniku u ranom otkrivanju supkliničkih slučajeva kar-

diomiopatije pasa (McEntee i sar., 1998; 2001). Pokazano je da dobutamin stres test (DST) kod pasa asimptomatičnih na dilatacionu kardiomiopatiju predstavlja osetljiv, neinvazivni dijagnostički metod u otkrivanju rane disfunkcije miokarda. Pored opravdanosti korišćenja DST u dijagnostičkom postupku pojedinih, pre svega supkliničkih patoloških stanja, nekoliko dodatnih razloga opravdava izbor procedure farmakološkog stres testiranja kod pasa. U slučaju farmakološkog stres testiranja puna kooperativnost pacijenta se ne zahteva, moguće je korišćenje invazivnih kao i neinvazivnih tehnika dijagnostičkih pregleda, test je ekonomičan, i na kraju, maksimalan odgovor može lakše da se prepozna nego u slučaju testa opterećenja (Freeman i sar., 1984; Tan i sar., 1989).

Kod rane disfunkcije leve komore bigla eksperimentalno izazvane ventrikularnim pejsingom, vrednosti za frakciono skraćanje (FS), PEP, LVET, PEP/LVET i srednju brzinu skraćanja vlakana leve komore (mVcf) posle infuzije dobutaminom, značajno se razlikuju od vrednosti kod klinički normalnih pasa. Vrednosti maksimalnih procentualnih promena za LVET i mVcf zbog DST su bile manje kod pasa sa ranom disfunkcijom leve komore. Ejekciono vreme leve komore se smanjuje u manjem stepenu tokom dobutamin infuzije kod pasa posle pejsinga, u poređenju sa vrednostima koje su postojale pre pejsinga. Sistolni vremenski intervali odražavaju globalnu sistolnu funkciju leve komore. Ejekciono vreme leve komore zavisi od kontraktilnosti miokarda, prethodnog opterećenja srca (preload), naknadnog opterećenja srca (afterload) i srčane frekvencije. Promene LVET kao odgovor na infuziju dobutamina kod pasa posle razvoja rane disfunkcije leve komore je u vezi sa manjim povećanjem kontraktilnosti i srčane frekvencije. Infuzija dobutamina indukuje manje povećanje u mVcf i veće smanjenje u PEP/LVET nakon ventrikularnog pejsinga u poređenju sa vrednostima pre pejsinga. Smanjenje u odnosu (količniku) PEP/LVET primećeno kod pasa sa ranom disfunkcijom leve komore tokom infuzije visokih doza dobutamina daje vrednosti koje su slične onima kod zdravih pasa (McEntee i sar., 2001). Ovaj rezultat je takođe primećen kod dobermana sa ranom DCM koji su podvrgnuti slaboj inotropnoj stimulaciji dobutaminom od 5 µg/kg/min (Minors i O'Grady, 1998). Tokom dobutamin stres ehokardiografije, visoke vrednosti dijametra leve komore na kraju sistole (LVESD) i sistolnog indeksa stresa zida, a redukovane vrednosti FS i odnosa brzine ranog i kasnog mitralnog punjenja (E/A) su povezani sa razvojem okultne DCM (Minors i O'Grady, 1998).

Da bi se prilagodio na povećane metaboličke zahteve u vezi sa testom opterećenja, regionalni nutritivni krvotok miokarda mora da se poveća. Ako kod pacijenta postoji značajna koronarna stenoza, infuzija dobutamina stvara heterogenost krvotoka miokarda. Sa korišćenjem dobutamina, heterogenost krvotoka miokarda je gotovo uvek povezana sa ishemičnim abnormalnostima pokreta zida miokarda (Wackers, 1993). U humanoj medicini se pojava ishemije pri DST registruje na osnovu regionalnih pokreta zida miokarda, korišćenjem ehokardiografije, pri čemu je leva komora podeljena na 16 segmenata miokarda prema modelu koji je predložilo Američko društvo ehokardiografije (Lang i sar., 2005). U veterinarskoj

medicini nisu uspostavljeni ehokardiografski pregledi sa aspekta provere regionalne pokretljivosti segmenata leve komore. Osim toga, koronarna arterijska bolest kod pasa ne predstavlja dominantno oboljenje, pa registrovanje regionalne ishemije miokarda može da bude nesvrishodno sa aspekta veterinarske kardiologije. Međutim, pojedina srčana oboljenja (hipertrofična kardiomiopatija, fibroza miokarda) "opterećuju" srce potencijalnom ishemijom. Metode korišćene u istraživanjima DST kod životinja odnosile su se na EKG, Dopler-sfigmomanometriju, M-modus, 2D-modus i Dopler-ehokardiografiju, pri čemu su ehokardiografska merenja korišćena za dobijanje parametara koji određuju sistolnu i dijasolnu srčanu funkciju. Ehokardiografski pregledi i merenja u DST su teški za izvođenje kod pasa zbog nekooperativnosti pacijenata (uznemirenost, dahtanje) sa jedne strane i karakteristika delovanja dobutamina (tahikardija) i njegovog kratkog trajanja efekata sa druge strane. Zbog toga treba razmotriti korišćenje drugih dijagnostičkih metoda, kao što su elektrokardiografija ili merenje koncentracije srčanih biomarkera (natrijumuretičnih peptida A i B, angiotenzina II), na šta ukazuju naša, kao i istraživanja drugih autora (McEntee i sar., 2000).

Protokoli u dosadašnjim istraživanjima su dugog trajanja (od 40 do 80 minuta) da bi se koristili u kliničkim uslovima, a jedino istraživanje DST kod kliničkih slučajeva koristilo je slabu inotropnu stimulaciju dobutaminom (5 µg/kg/min). Korišćenje agresivnijeg protokola sa postepenim povećanjem doze u kraćim vremenskim intervalima zadovoljava mogućnosti korišćenja u kliničkim uslovima, povećava značajno srčane performanse bez izazivanja ozbiljnih neželjenih efekata. Takođe je potrebno razmotriti korišćenje drugog leka, uz dobutamin, u onim slučajevima kada psi nemaju adekvatan odgovor povećanja srčane frekvencije. Pored odabira protokola, posebno je značajno formulisati drugačije krajnju tačku protokola. U dosadašnjim istraživanjima DST, krajnja tačka testa odnosila se na povišenje frekvencije preko 200/min, pojavu aritmija ili nekontrolisanog uzbuđenja kod pasa, što zapravo predstavlja neželjene efekte DST.

Za razvoj kliničkog testa doziranje dobutamina treba da bude takvo da proizvodi signifikantno povećanje srčanih performansi bez indukovanja previše neželjenih efekata. Davanje dobutamina postepenim povećanjem doze, umesto pojedinačne visoke doze, redukuje razvoj neželjenih efekata (McEntee i sar., 2001). Naša iskustva sa DST takođe govore u prilog ovakvoj tvrdnji.

Opisani su srčani i nesrčani neželjeni efekti kod ljudi u vezi sa visokim dozama DST (Mertes i sar., 1993). Razvoj srčanih aritmija nakon primene dobutamina kod svesnih pasa se javlja u niskom stepenu (Tuttle i Mills, 1975; McEntee i sar., 1996; McEntee i sar., 2001). Nije ustanovljeno postojanje neželjenih srčanih efekata pri ispitivanjima DST kod pasa sa eksperimentalno izazvanom ranom disfunkcijom leve komore, čak ni pri visokim dozama dobutamina, dozama znatno višim od terapijskih. Pošto su ispitivanja sprovedena na psima rase bigl, sigurnost DST ne može da se ekstrapolira na druge rase, koje su predisponirane srčanim aritmijama, niti na pse sa spontanim javljanjem DCM.

Najčešće aritmije koje su opisane kod ljudi u vezi sa DST bile su komorni prevremeni kompleksi (VPCs), pretkomorni prevremeni kompleksi (APCs), neprodužena ventrikularna tahikardija. Pojava ozbiljnih aritmija tokom DST je retka, pacijenti ih dobro tolerišu i retko zahtevaju tretman (Mertes i sar., 1993; Katrišis i sar., 2005). Razvoj aritmija objašnjava se stimulacijom β 1 adrenergičkih receptora, dobutamin indukovanom redukcijom koncentracije kalijuma plazme, kao i pojavom ishemije kod nekih pacijenata. Naša istraživanja na psima (neobjavljeni podaci), kao i istraživanja sprovedena na konjima (Frye i sar., 2003) su pokazala smanjenje koncentracije ovog elektrolita u serumu.

Pored aritmija, neželjeni srčani efekat opisan kod humanih pacijenata bila je ishemija. Prema našim istraživanjima, ishemija miokarda može da se registruje elektrokardiografski i kod pasa bez oboljenja KV sistema, a može da se dovede u vezu sa visokim srčanim frekvencijama razvijenim pri visokim dozama dobutamina tokom DST (neobjavljeni podaci). Išemija u vezi sa DST kod ljudi je prolaznog karaktera. Prekidanje aplikacije DST je najčešće sve što je potrebno za rešavanje ovakvog problema, dok kod izvesnog broja pacijenata sublingvalna aplikacija nitroglicerina ili intravenska aplikacija β -blokatora predstavlja tretman za simptomatsku ishemiju (Mertes i sar., 1993).

Nesrčani neželjeni efekti kod pasa u vezi sa DST su povraćanje, dah-tanje i kongestija mukoznih membrana. Povraćanje se javlja kod pasa pri visokim dozama dobutamina (32,5; 37,5 i 42,5 μ g/kg/min.). Povraćanje spontano prestaje, bez tretmana medikamentima. Nijedan od neželjenih efekata ne zahteva prekidanje funkcionalnog ispitivanja, odnosno zaustavljanje infuzije dobutamina. Međutim, povraćanje privremeno ometa odgovor na dobutamin (zbog vagusnog refleksa) i primorava na produženje infuzije dobutamina. Dahtanje tokom DST otežava izvođenje ehokardiografskog pregleda (McEntee i sar., 1996; McEntee i sar., 2001).

Literatura / References

1. Bonagura JD, Kirk RW. Kirk's Current veterinary therapy. Bonagura J.D, Kirk RW, editors, Philadelphia: WB Saunders, 1995.
2. Calvert CA. Canine dilated cardiomyopathy. In: Kirk RW, Bonagura JD, editors, Current Veterinary Therapy, Philadelphia: WB Saunders, 1992: 773-9.
3. Fleg JL, Pina IL, Balady GJ, Chaitman BR, Fletcher B, Lavie C, Limacher MC, Stein RA, Williams M, Bazzare T. Assessment of functional capacity in clinical and research applications. *Circulation* 2000; 102: 1591-7.
4. Freeman ML, Palac R, Mason J, Bernes WE, Eastman G, Virupannavar S, Loeb HS, Kaplan E. A comparison of dobutamine infusion and supine bicycle exercise for radionuclide cardiac stress testing. *Clinical Nuclear Medicine* 1984; 9: 251-5.
5. Frye MA, Bright JM, Dargatz DA, Fettman MJ, Frisbie DD, Baker DC, Traub-Dargatz JL. A comparison of dobutamine infusion to exercise as a cardiac stress test in healthy horses. *J Vet Intern Med* 2003; 17(1): 58-64.

6. Gulati M, McBride PE. Functional capacity and cardiovascular assessment: Submaximal exercise testing and hidden candidates for pharmacologic stress. *Am J Cardiol* 2005; 96 (suppl): 11J-9J.
7. Hinds JE, Hawthorne EW. Comparative cardiac dynamic effects of dobutamine and isoproterenol in conscious instrumented dogs. *Am J Cardiol* 1975; 36: 894-901.
8. Hoffman R, Lethen H, Kleinhans E, Flachskampf FA, Hanrath R. Comparative evaluation of bicycle and dobutamine stress echocardiography with perfusion scintigraphy and bicycle electrocardiogram for identification of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993; 72: 555-9.
9. Jewitt D, Mitchell A, Birkhead J, Dollery C. Clinical cardiovascular pharmacology of dobutamine, a selective inotropic catecholamine. *Lancet* 1974; 2: 363-7.
10. Katritsis DG, Karabinos I, Papadopoulos A, Simeonidis P, Korovesis S, Giazitzogou E, Karvouni E, Vordis E. Sustained ventricular tachycardia induced by dobutamine stress echocardiography: A prospective study. *Europace* 2005; 7: 433-9.
11. Kim H-J, Ahn SJ, Park SW, Cho BR, Sung J, Hong S-H, Park P-W, Hong K-P. Cardiopulmonary exercise testing before and one year after mitral valve repair for severe mitral regurgitation. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1187-9.
12. Lang R, Bierig M, Devereux R, Flachskampf F, Foster E, Pellikka P. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the chamber quantification writing group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 1440-63.
13. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR. Peak exercise oxygen pulse and prognosis in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2004; 93: 588-93.
14. Liang C, Hood WB. Dobutamine infusion in conscious dogs with and without autonomic nervous system inhibition, effects on systemic hemodynamics, regional blood flows and cardiac metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 211: 698-705.
15. Liang C, Yi JM, Sherman LG, Black J, Gavras H, Hood WB. Dobutamine infusion in conscious dogs with and without acute myocardial infarction: Effects on systemic hemodynamics, myocardial blood flow, and infarct size. *Circ Res* 1981; 49: 170-80.
16. Mannering D, Cripps T, Leech G, Mehta N, Valentine H, Gilmour S, Bennett ED. The dobutamine stress test as an alternative to exercise stress testing after acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1988; 59: 521-6.
17. McEntee K, Amory H, Pypendop B, Balligand M, Clercx C, Michaux C, Jacquemot O, Robert F, Gerard P, Pochet T, Henroteaux M. Effects of dobutamine on isovolumic and ejection phase indices of cardiac contractility in conscious healthy dogs. *RVS* 1998; 64: 45-50.
18. McEntee K, Clercx C, Flandre T, Jonville E, Pynnaert C, VanBeneden R, Ketelslegers JM, Michaux C, Balligand M, Miserque N, Henroteaux M. Hormonal response to dobutamine cardiac stress testing in a conscious canine model of early left ventricular dysfunction induced by chronic rate overload. *J Vet Cardiol* 2000; 2(2): 7-14.
19. McEntee K, Clercx C, Pypendop B, Peeters D, Balligand M. Cardiac performance in conscious healthy dogs during dobutamine infusion, *RVS* 1996; 61: 234-9.
20. McEntee K, Clercx C, Soyeur D, Amory H, Michaux C, Flandre T, Jonville E, Pynnaert C, Miserque N, Henroteaux M. Usefulness of dobutamine stress tests for detec-

- tion of cardiac abnormalities in dogs with experimentally induced early left ventricular dysfunction. *Am J Vet Res* 2001; 62: 448-55.
21. Mertes H, Sawada SG, Ryan T, Segar DS, Kovacs R, Foltz J, Feigenbaum H. Symptoms, adverse effects and complications associated with dobutamine stress echocardiography. Experience in 1118 patients. *Circulation* 1993; 88: 15-9.
 22. Miller MS, Tilley LP. Manual of canine and feline cardiology. 2nd edn, Philadelphia: WB Saunders, 1995.
 23. Minors SL, O'Grady MR. Resting and dobutamine stress echocardiography factors associated with the development of occult dilated cardiomyopathy in healthy Doberman Pincher dogs. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 369-80.
 24. Sonnenblick EH, Frishman WH, LeJemtel TH. Dobutamine: a new synthetic cardioactive sympathetic amine. *N Engl J Med* 1979; 300: 17-22.
 25. Tan LB. Clinical and research implication of new concepts in the assessment of cardiac pumping performance in heart failure. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 615-22.
 26. Tan LB, Bain RJI, Littler WA. Assessing cardiac pumping capability by exercise testing and inotropic stimulation. *Br Heart J* 1989; 62: 20-5.
 27. Thomas GS, Miyamoto MI. Should Simultaneous exercise become the standard for adenosine myocardial perfusion imaging. *Am J Cardiol* 2004; 94 (supl): 3D-11D.
 28. Tuttle RR, Mills J. Development of new catecholamine to selectively increase cardiac contractility. *Circ Res* 1975; 36: 185-96.
 29. Vatner SF, McRitchie RJ, Braunwald E. Effects of dobutamine on left ventricular performance, coronary dynamics and distribution of cardiac output in conscious dogs. *J Clin Invest* 1974; 53: 1265-73.
 30. Wackers FJTh. Which pharmacological stress is optimal. Editorial comment. *Circulation* 1993; 87(2): 646-8.

ENGLISH

**POSSIBILITIES OF APPLYING PHARMACOLOGICAL STRESS TESTING IN
ASSESSMENT OF HEART FUNCTIONAL CAPACITY IN DOGS**

Ljubica Spasojević Kosić, D. R. Trailović

Systolic and diastolic heart functions, evaluated using echocardiography, do not reflect the functional capacity of the patient and they cannot explain the occurrence of symptoms during a certain degree of activity. Evaluation of the functional capacity is an integral part of cardiological examinations in human medicine. Functional examinations of the heart can be carried out using the body burden test or pharmacologically. Investigations carried out so far into canine cardiology have not contributed to the clinical implementation of functional heart examinations in dogs. Pharmacological stress testing is an optimal way to perform a functional heart examination in dogs. Since it reflects the effects of moderate physical activity, dobutamine has been recommended as the medicine of choice for provoking a pharmacological stress test. This work presents a review of the results of the most important investigations, as well as our own investigations, of the application of

the dobutamine stress test (DST) in dogs, and the problems in investigations so far have been considered and future directions for DST investigations pointed out.

Key words: functional heart examination, dobutamine stress test, dog

РУССКИЙ

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕСС ТЕСТА В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ИСПЫТАНИИ СЕРДЦА У СОБАК

Любича Спасоевич Косич, Д. Р. Траилович

Систольная и диастолическая сердечная функция, оцененные эхокардиографически, не отражают функциональную мощность пациента, ни могут объяснить явление симптомов при определённой степени активности. Оценка функциональной мощности составная часть кардиологических осмотров в гуманной медицине. Функциональное испытание сердца можно провести тестом нагрузки или фармакологически. Бывшие до сих пор исследования в кардиологии собак не содействовали клиническому употреблению функционального испытания сердца у собак. Фармакологический стресс тест оптимальный способ функционального испытания сердца у собак. Так как подражает эффекты умеренной активности, добутамин предложен в качестве лекарства выбора для вызывания фармакологического стресс теста. В этой работе даны осмотры результатов самых значительных исследований, словно и наших исследований применения добутамин стресс теста (ДСТ) у собак, обозначены недостатки бывших до сих пор исследований и указано на будущие направления исследований (ДСТ).

Ключевые слова: функциональное испытание сердца, добутамин стресс тест, собака

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE U BEOGRADU 2009-2010. GODINE

Đurić, Miodrag, Jelena

Rođena 19. 01. 1986. u Beogradu
Diplomirala 20. 11. 2009.
Stalno mesto boravka Beograd
Jurija Gagarina 55/8

Vučičević, Zoran, Miloš

Rođen 17. 01. 1985. u Beogradu
Diplomirao 20. 11. 2009.
Stalno mesto boravka Beograd
Bulevar oslobođenja 43

Jočić, Živan, Maja

Rođena 03. 05. 1976. u Beogradu
Diplomirala 24. 12. 2009.
Stalno mesto boravka Umka
Karađorđeva 52

Milošević, Dragan, Sandra

Rođena 07. 09. 1985. u Beogradu
Diplomirala 30. 12. 2009.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Nehruova 60/9

Jovanović, Miroslav, Marko

Rođen 09. 09. 1981. u Beogradu
Diplomirao 05.03. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Bul. Kralja Aleksandra 250/III

Petrić, Radenko, Vladana

Rođena 14. 10. 1983. u Šapcu

Diplomirala 09. 03. 2010.

Stalno mesto boravka Bogatić
Mačvanska 33

Čairović, Vićentije, Vladimir

Rođen 25. 06. 1981. u Smed. Palanci
Diplomirao 10. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Smed. Palanka
Milana Kršljanina 7

Stanišić, Svetolik, Dragan

Rođen 14. 02. 1981. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 10. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Mala Obarska

Dimitrijević, Miroslav, Marija

Rođena 13. 05. 1980. u Beogradu
Diplomirala 16. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Cvijićeva 112-120/III

Đurić, Branko, Ivana

Rođena 07. 09. 1980. u Beogradu
Diplomirala 16. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Bulevar oslobođenja 51

Jović, Milovan, Veroljub

Rođen 03. 03. 1980. u Kraljevu
Diplomirao 17. 03. 2010.

Stalno mesto boravka Čukojevac
Stubal 353

Dragutinović, Dragan, Ivana
Rođena 02. 05. 1979. u Beogradu
Diplomirala 22. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Bul. Kralja Aleksandra 290/31

Đurić, Veselin, Duško
Rođen 01. 10. 1984. u Gračanici, BiH
Diplomirao 22. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Porječina
Petrovo

Trajković, Dušan, Miloš
Rođen 30. 12. 1981. u Smederevu
Diplomirao 22. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Čačak
Dragačevska 2/1

Živanović, Slobodan, Milan
Rođen 12. 09. 1980. u Šapcu
Diplomirao 22. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Dublje
Vojvode Ž. Mišića 26

Jovanović, Ljubinko, Valentina
Rođena 07. 11. 1967. u Nikšiću
R. Crna Gora
Diplomirala 23. 03. 2010.

Radović, Nikola, Veljko
Rođen 28. 12. 1982. u Beogradu
Diplomirao 23. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Paraćin
Nikola Tesla b.b.

Stanisavljević, Milosav, Dalibor
Rođen 17. 01. 1982. u Jagodini
Diplomirao 24. 03. 2010.
Stalno mesto boravka selo Grabovica

Devenica, Biljana, Martina
Rođena 19. 06. 1982. u Banja Luci
R. Srpska, BiH
Diplomirala 24. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Sime Šolaje 5

Medić, Dušan, Vanja
Rođena 24. 09. 1980. u Kninu,
R. Hrvatska
Diplomirao 24. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Jajinci
Slobodana Jovića 39V

Pešić, Vojislav, Danijela
Rođena 19. 01. 1980. u Vranju
Diplomirala 29. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Carice Milice 11/1

Stanojević, Dragan, Dejan
Rođen 11. 01. 1984. u Šapcu
Diplomirao 29. 03. 2010.
Stalno mesto boravka Debrč
Suvo Selo b.b.

Ciganović, Pavle, Vladimir
Rođen 26. 03. 1980. u Sarajevu, BiH
Diplomirao 08. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Senta
Kej Tisin cvet 8

Đorđević, Predrag, Ivana
Rođena 17. 10. 1980. u Jagodini
Diplomirala 08. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Jagodina
Radmila Đorđevića 16/12

Zdravković, Dobrivoje, Slaviša
Rođen 25. 11. 1984. u Gacku
R. Srpska, BiH
Diplomirao 14. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Mladenovac
Pružatovačka 44

Poljak, Đura, Miroslav

Rođen 07. 07. 1983. u Zrenjaninu
Diplomirao 15. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Ostojićevo
Maršala Tita 69

Jelić, Petar, Dalibor

Rođen 15. 07. 1972. u Sisku
R. Hrvatska
Diplomirao 20. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Kaluđerica
Žarka Zrenjanina 4d

Jović, Milenko, Bojan

Rođen 22. 04. 1981. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 20. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Jasenovačkih mučenika 21

Marić, Ivan, Golub

Rođen 07. 01. 1967. u Vijencu,
Pijevlja, R. Crna Gora
Diplomirao 20. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Prijepolje
Seljašnica b.b.

Nikolić, Zlatko, Zoran

Rođen 12. 04. 1969. u Pasjanu,
Gnjilane
Diplomirao 20. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Pasjane,
Gnjilane

Dugić, Jovo, Nenad

Rođen 19. 11. 1984. u Gradačcu, BiH
Diplomirao 21. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Ace Joksimovića 104

Pantić, Dragoslav, Miloš

Rođen 26. 10. 1982. u Beogradu
Diplomirao 21. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Mladenovac
Selište 12, Rajkovac

Stojanović, Miroslav, Marko

Rođen 19. 07. 1977. u Beogradu
Diplomirao 21. 04. 2010
Stalno mesto boravka Beograd
Vojvode Stepe 249/8

Veljković, Jezdimir, Igor

Rođen 27. 07. 1977. u Leskovcu
Diplomirao 21. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Leskovac
Ilije Strele 5/15

Trošić, Milenko, Zorka

Rođena 12. 03. 1980. u Beogradu
Diplomirala 22. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Đuje i Dragoljuba 9

Krstić, Slobodan, Marija

Rođena 26. 05. 1980. u Beogradu
Diplomirala 23. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Batajnica
Ratarska 24

Milanović, Toma, Sanja

Rođena 01. 02. 1984. u Beogradu
Diplomirala 23. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Čingrijina 31

Jovičić, Dragutin, Milan

Rođen 20. 06. 1978. u Derventi,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 26. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Prnjavor
Rade Vranješević 4

Vlajić, Vaso, Goran

Rođen 04. 07. 1981. u Banja Luci,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 26. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Lovćenska 79

Milošević, Bogomir, Marina

Rođena 27. 03. 1985. u Zaječaru
Diplomirala 28. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Zaječar
Pere Radovanovića E4/15

Srdić, Branislav, Danko

Rođen 16. 11. 1980. u Banja Luci,
R. Srpska, BiH

Diplomirao 28. 04. 2010.

Stalno mesto boravka Čelinac
Petra Dujića Starog bb

Todorović, Dragoslav, Milica

Rođena 31. 12. 1984. u Beogradu
Diplomirala 29. 04. 2010.
Stalno mesto boravka Grabovac
Selo Ljubinić 91

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

VETERINARSKI GLASNIK je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, koji se izdaje u saradnji sa suizdavačem Veterinarskom komorom Srbije. Časopis objavljuje originalne i pregledne radove, izveštaje sa kongresa i stručnih sastanaka, prikaze knjiga, radove iz istorije veterinarske medicine, dopise za rubriku Sećanje, kao i komentare i pisma Uredništvu u vezi sa objavljenim radovima.

Sve prispele rukopise Uređivački odbor, odnosno glavni i odgovorni urednik šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene i dopune, tada se kopija recenziranog rukopisa dostavlja autoru (autorima) s molbom da tražene izmene unesu u tekst ili pak u protivnom da argumentovano izraze svoje neslaganje sa datim primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik zajedno sa Uređivačkim odborom.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, a kratak sadržaj se prevodi na engleski i ruski. Radovi stranih autora, van srpskog, hrvatskog i bošnjačkog govornog područja se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom i ruskom jeziku.

Molimo saradnike da svoje radove za Veterinarski glasnik pišu jasno, koncizno, racionalno, gramatički ispravno i u skladu sa sledećim uputstvima.

OPŠTA UPUTSTVA

Tekst rada se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, fontom Times New Roman, duplim proredom i veličinom slova 12 tačaka (12 pt). Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, veličinu stranice na A₄, sa levim poravnanjem i uvlačenjem svakog pasusa za 10 mm. Ukoliko se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rada dostaviti odštampan jednostrano na belom papiru formata A₄ u dva primerka, zajedno sa elektronskom verzijom. Stranice numerisati redom u okviru donje margine (sa desne strane) počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se u zagradi prezimenom autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko ima više od dva autora, tada se u zagradi piše samo prezime prvog autora uz dodatak "i sar.," pa godina (npr. Petrović i sar., 1987).

NASLOVNA STRANA

Na posebnoj prvoj stranici treba napisati sledeće:

– Naziv članka, odnosno rada, treba pisati velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica.

– Imena autora pisati ispod naslova punim imenom i prezimenom sa titulom i zvanjem zvanjem, bez podvlačenja i veznika, već razdvojena samo zarezom. Iznad prezimena se zvezdicom (jednom ili više) označava ustanova u kojoj radi autor (autori). Zvezdice se stavljaju u superskriptum na kraju svakog prezimena.

- Tačan naziv ustanove (i mesta u kojima se nalazi) u kojima autori rade, treba navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu autora u radu.
- Na dnu stranice treba navesti ime i prezime (adresu, broj telefona, faksa ili e-mail) jednog od autora, radi korespondencije

KRATAK SADRŽAJ

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i prošireni kratak sadržaj rada, obima jedne stranice A4 formata. Pored naslova i imena autora, kratak sadržaj treba da sadrži uvod, materijal i metode, rezultate, diskusiju i zaključak. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti ključne reči (optimalno tri do šest).

PISANJE TEKSTA

Svi podnaslovi se pišu malim slovima i boldovano. U radu koristiti kratke i jasne rečenice. Sve strane reči za koje postoji odgovarajuće ime u našem jeziku treba zameniti tim nazivom tj. da prevod bude u duhu srpskog jezika. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (ili kako to još neko naziva generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se pak želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovačkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Određene supstancije ili hemikalije, koje se označavaju slovima i brojkama, moraju se precizno označiti stavljanjem broja iznad (superskriptum) ili ispod slova (subskriptum) (npr. IL-6, H₂O, B₁₂, CD₈). U radu se mogu koristiti određene skraćenice, ali samo kada je to neophodno (npr. kod dugačkih imena hemijskih jedinjenja) ili kada se takve skraćenice već nalaze u literaturi, odnosno kao takve su već prepoznatljive (npr. DNK). Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, a u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zare-zom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta, izbegavati veliki broj priloga.

Tabele se označavaju arapskim brojevima (iznad tabela) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se u tabeli koriste skraćenice, iste treba objasniti u legendi ispod tabele. Svaku tabelu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Grafikoni se takođe označavaju arapskim brojevima (ispod grafikona) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, iste treba objasniti u legendi ispod grafikona. Svaki grafikon treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jedan.

Sheme (crteži) se označavaju arapskim brojevima (ispod shema) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 10 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, iste treba objasniti u legendi ispod sheme. Svaku shemu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Fotografije se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji). Na poledini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Zbog kvalitetnije reprodukcije preporučljivo je slike dostavljati u elektronskom obliku (nastavak: jpg, tif ili sl., ne "uvlačiti" ih u "Word" format). U prilogu papirne forme teksta rada treba odštampati fotografiju sa odgovarajućom legendom i oznakom rednog broja.

POGLAVLJA RADA

Poglavlja rada su: **Uvod, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija (ili Rezultati i diskusija zajedno), Zaključak i Literatura.**

U uvodu treba ukazati na najvažnije, odnosno najnovije činjenice i poglede, vezane za temu rada, sa kratkim obrazloženjem cilja sopstvenih ispitivanja.

Materijal i metode rada – U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogledi izvedeni, materijal i životinje na kojima su izvedeni, kao i metode koje su korišćene u ogledu.

Rezultati – Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda treba da stoji redni broj i tekst, koji opisuje šta određena slika, tabela, grafikon ili shema prikazuje. Redni broj sa tekstom se stavlja iznad tabela, a kod svih ostalih prezentacija ispod. Autor mora tačno da naznači mesto u tekstu gde želi da bude prikazan određeni prilog.

Diskusija – U ovom poglavlju autor analizira dobijene rezultate i iste upoređuje sa rezultatima i mišljenjima drugih autora, te pokušava istaći njihov teorijski i praktični značaj.

Literatura – Autor treba da navede literaturne podatke, odnosno radove, koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija, ako je moguće da ne bude starija od 5 godina. Reference treba pisati jednu ispod druge, numerisati ih arapskim brojevima i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Ukoliko tekst reference ne može da stane u jedan red, tada se red koji sledi uvlači ispod prethodnog, jednim pritiskom na tabulator. Broj referenci nije u principu ograničen ali se preporučuje da ne bude veći od 30. Izbegavati korišćenje abstrakta kao reference. Reference članaka, koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao "u štampi" i priložiti dokaz o prihvatanju rada. Reference se citiraju prema "Vankuverskim pravilima", koja su zasnovana na formatima koja koriste National Library of Medicine i Index Medicus. Naslove časopisa takođe treba skraćivati prema načinu koji koristi Index Medicus (ne stavljati tačke posle skraćenice). Stranice se citiraju tako što se navode početna

stranica, a krajnja bez cifara koje se ponavljaju (npr. 134-138 se navode kao 134-8).

Primeri:

1. Članak u časopisu:

Petrović M, Rakić L. Uticaj selena na razvoj pilića. *Živinarstvo* 2005; 2(7): 234-9.
Knežević B. Kvantitativni parametri radova u medicini. *Perod Biolog* 1990; 92(2): 241-3.

2. Knjige i druge monografije:

Borojević S. Metodologija eksperimentalnog naučnog rada. 2. izd. Novi Sad: Radnički univerzitet "Radivije Čirpanov", 1978.
Colson JH, Armour WJ. Sports injuries and their treatment. 2nd rev. ed. London: S Paul, 1986.
Mihajlov AI, Černyj AI, Giljarevskij PS. Naučnie komunikacii i informatika. Moskva: Izdateljstvo "Nauka", 1976.
Plumb DC. Veterinary Drug Handbook. 4th edition. Iowa/Ames: Iowa State University Press, 2002.

3. Poglavlja u knjizi:

Pantelić D. Naučni metod. U: Pantelić D, Vesley-Tanasković I, Radotić M, Savić B, Kuzmanović M, Vojvodić V, i dr. Metodologija naučnoistraživačkog rada u medicinsko-biološkim naukama. Beograd: Vojnoizdavački zavod, 1977: 7-37.
Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editros. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-72 .

4. Rad ili abstrakt u Zborniku radova:

Ćupić V, Trailović D, Dobrić S, Velez R. Značaj racionalne primene lekova u veterinarskoj medicini. *Proceeding of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid, Macedonia*, 3-7. September 2005: 207-9.
Ćupić V, Trailović D. Neracionalna primena lekova u veterinarskoj medicini – rizik po zdravlje ljudi. *Zbornik kratkih sadržaja radova 16. savetovanja veterinarara Srbije sa međunarodnim učešćem. Zlatibor, Srbija, 8-10 Septembar, 2004*: 223-34.

NAPOMENA

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

ADRESA ČASOPISA

Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik
11000 Beograd, Bulevar oslobođenja 18,
tel/faks 011/ 2684-597, 2687-475; e-mail: vetks@Eunet.rs