

VETERINARSKI GLASNIK
VOL. 65
BROJ 1 - 2
STRANA 1-150
Beograd 2011.

1 -2

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. 65 Br. 1-2 Str. 1 - 150 Beograd, 2011.

IZDAVAČ:

FAKULTET VETERINARSKOG MEDICINSKOG UNIVERZITETA U BEOGRADU
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE UNIVERSITY OF BELGRADE
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ УНИВЕРСИТЕТА В БЕЛГРАДЕ

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

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

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD:

Vojin Ivetić, Milovan Jovićin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Vesna Matekalo-Sverak, Jadranka Tijanić, Dragiša Trajlović

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 prosvete i nauke Republike Srbije
Publication of this journal is financially supported by:
Ministry of Education and Science, Republic of 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 VETERINARSKE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK

Vol. 65

Br. 1 - 2

str. 1-150

Beograd, 2011.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Bojković-Kovačević Slavica, Jeremić I., Kirovski Danijela, Polovina M., Vujanac I., Prodanović R., Milošević S.: Uticaj energetskog dodatka u ishrani krava tokom peripartalnog perioda na vrednosti pojedinih biohemijskih parametara krvi
Influence of Peripartum Dietary Energy Supplementation on some Blood Biochemical Parametars in Dairy Cows
Влияние энергетической добавки в кормлении коров в течение дородового периода на стоимости некоторых биохимических параметров крови.

■ Fratrić Natalija, Gvoždić D., Savić Olivera, Jagličić Ivana, Ilić Vesna: Imunski kompleksi u krvnom serumu teladi sa kliničkim simptomima bronhopneumonije
Immune Complexes in Blood Serum of Calves with Clinical Symptoms of Bronchopneumonia
Иммунные комплексы в кровяном серуме телят с клиническими симптомами бронхопневмонии.

■ Andonova Maria, Dimitrova Dimitritchka, Borissov I.: Nonspecific Defense Mechanisms in Dogs During Experimental Staphylococcal Infection
Nespecifični odbrambeni mehanizmi kod pasa u toku eksperimentalne infekcije stafilokokama
Неспецифические оборонительные механизмы у собак в течение экспериментальной инфекции стафилококками

■ Kureljušić B., Savić B., Prodanović R., Đekić J., Adamov V., Jakić-Dimić Dobrila, Miljković Biljana, Radanović O., Ivetić V.: Primena različitih histohemijskih metoda u dijagnostici aspergiloze mozga kod čuđica
Implementation of Different Histochemical Methods in Diagnostics of Brain Aspergillosis in Turkey Chicks
Применение различных гистохимических методов в диагностике аспергиллозы мозга у индышат.

■ Mujezinović Indira, Čupić V., Smajlović A., Muminović M.: Identification of Serotonergic 5H_{1A}-type Receptors in Broiler Small Intestine by Application of Serotonin and its Agonists and Antagonists
Utvrđivanje serotonergičnih receptora 5HT_{1A} tipa u tankom crijevu brojlera primjenom serotonina i njegovih agonista i antagonista
Утверждение серотонергичных рецепторов 5H_{1A} тип в тонкой кишке бройлеров применением серотонина и его агонистов и антагонистов

| | |
|---|-----|
| ■ Rogić Biljana, Važić B., Jovanović S., Stamenković-Radak Marina, Savić Mila, Ravić I.: Ispitivanja varijabilnosti morfometrijskih karakteristika buše i gatačkog goveda u cilju očuvanja autohtonog genoma Investigations of Variability of Morphometric Characteristics in Busa and Gatack Cattle in Order to Preserve Autochthonous Genome Испытания изменчивости морфометрических характеристик буши и гатачкой головы крупного рогатого скота с целью сохранения автохтонного генома . . . | 61 |
| ■ Homšek Irena, Popadić Dragica, Simić Slobodanka, Ristić Slavica, Vučićević Katarina, Miljković Branislava: Predviđanje resorpcije i farmakokinetičkog profila karbamazepina iz tableta sa kontrolisanim oslobođenjem kod ljudi korišćenjem modela kunića Predicting Absorption and Pharmacokinetic Profile of Carbamazepine from Controlled-Release Tablet Formulation in Humans Using Rabbit Model Предвидение резорбции фармакокинетического профиля карбамазепина из таблеток с контролированным освобождением у людей пользованием моде- ли кроликов | 71 |
| ■ Vesković Moračanin Slavica, Turubatović L., Rašeta M., Stefanović S., Janković S., Škrinjar Marija: STANDARDNE RADNE PROCEDURE U PROIZVODNJI SREMSKE TRADICIONALNO FERMENTISANE KOBASICE Standard Working Procedures in Production of Traditionally Fermented Sremska Sausage Стандартные рабочие процедуры в производстве "сремской" традиционно ферментированной колбасы | 83 |
| PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ | |
| ■ Stevanović Jelka, Borožan Sunčica, Jović S., Ignjatović I.: Fiziologija slobodnih radikala Physiology of Free Radicals Физиология свободных радикалов | 95 |
| ■ Vučinić Marijana: Povrede i poremećaji zdravlja veterinara neinfektivne etiologije Injuries and Noninfective Health Disorders of Veterinarians Повреждения и здравоохранительные расстройства ветеринаров неинфек- ционной этиологии | 109 |
| ■ Aleksić Jelena, Jović S., Merćep Drinka: Uloga veterinara u prepoznavanju i prevenciji slučajeva zlostavljanja životinja Role of Veterinarians in Recognition and Prevention of Animal Abuse Роль ветеринаров в узнавании и превенции случаев истязания животных . . . | 123 |
| ■ Branislava Mitrović, Gordana Vitorović, Mirjana Stojanović, D. Vitorović: Radioaktivnost fosfatnih mineralnih proizvoda Radioactivity of Phosphate Mineral Products Радиоактивность фосфатных минеральных продуктов | 133 |
| DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТИ - ДОК- ТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ | |
| ■ UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS | 147 |

**UTICAJ ENERGETSKOG DODATKA U ISHRANI KRAVA
TOKOM PERIPARTALNOG PERIODA NA VREDNOSTI
POJEDINIХ BIOHEMIJSKИХ PARAMETARA KRVI^{*}**

*INFLUENCE OF PERIPARTUM DIETARY ENERGY
SUPPLEMENTATION ON SOME BLOOD BIOCHEMICAL
PARAMETERS IN DAIRY COWS*

Slavica Bojković-Kovačević, I. Jeremić, Danijela Kirovski, M. Polovina,
I. Vujanac, R. Prodanović, S. Milošević^{**}

Cilj istraživanja izloženog u ovom radu je bio da se utvrdi uticaj energetskog dodatka na bazi propilen-glikola na vrednosti parametara metaboličkog profila krava u peripartalnom periodu. Petnaest dana pre očekivanog teljenja odabранo je 40 krava, koje su podjeljene u dve grupe: kontrolnu ($n=20$) i oglednu ($n=20$). Kravama u oglednoj grupi u periodu od 15 dana pre do 30 dana posle teljenja u hranu je dodavan preparat na bazi propilen-glikola ("OSIMOL", Veyx-Pharma GmbH, Nemačka) u dnevnoj količini od 200 grama. Uzorci krvi su uzeti 15 dana pre i 10 dana nakon teljenja. Neposredno nakon vađenja krvi, u uzorcima pune krvi, određivana je koncentracija glukoze i betahidroksibuterne kiseline (BHBA). U uzorcima krvnog seruma određivana je koncentracija ukupnih proteina, albumina, ureje i ukupnog bilirubina. U antepartalnom periodu, kod krava kontrolne i ogledne grupe, nisu ustanovaljene značajne razlike između prosečnih vrednosti ispitivanih parametara metaboličkog profila. Posle partusa kod krava kontrolne grupe koncentracija glukoze je bila niža od fiziološki prihvatljive ($x=1,93\pm0,43 \text{ mmol/l}$), dok je kod krava ogledne grupe glikemija bila na gornjoj fiziološkoj granici ($x=3,13\pm0,33 \text{ mmol/l}$) i statistički značajno viša nego kod kontrolne grupe ($p<0,001$). Koncentracija BHBA kod krava koje su dobijale energetski dodatak ("OSIMOL") izno-

* Rad primljen za štampu 14. 02. 2011. godine

** Slavica Bojković-Kovačević, dr vet. med., Ivan Jeremić, dr vet. med. Veterinarska stanica PKB d.o.o., Beograd; dr sci vet. med. Danijela Kirovski, docent Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; mr sci med. vet. Mladen Polovina, Veterinarska stanica PKB d.o.o., Beograd; dr sci vet. med. Ivan Vujanac, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr vet. med. Radiša Prodanović, istraživač pripravnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr vet. med. Svetozar Milošević, stručni saradnik, SI Poljovet, Beograd

sila je $0,40 \pm 0,12 \text{ mmol/l}$, dok je kod krava kontrolne grupe bila značajno veća ($p < 0,001$) i prosečno iznosila $0,88 \pm 0,39 \text{ mmol/l}$. Osim toga, kod krava ogledne grupe koncentracija ukupnog bilirubina je bila u granicama fizioloških vrednosti ($x = 4,09 \pm 1,42 \mu\text{mol/l}$), dok je kod krava kontrolne grupe ta vrednost bila značajno veća ($p < 0,05$) i iznosiла je $10,19 \pm 5,16 \mu\text{mol/l}$.

Ključne reči: krava, peripartalni period, energetski dodatak, biohemski parametri krvi

Uvod / Introduction

U periodu oko teljenja kod visokomlečnih krava nastaju najznačajnije promene u energetskom metabolizmu (Drackley, 1999; Grummer i sar., 2010). Odmah nakon teljenja, sa početkom laktacije, povećavaju se potrebe za energijom koje se većim delom zadovoljavaju iz alimentarnih izvora, a drugim delom mobilizacijom i razlaganjem masti iz telesnih depoa. U najranijoj fazi laktacije kod krava postoji stalna opasnost od poremećaja metabolizma, koje karakteriše smanjivanje intenziteta glukoneogeneze i intenziviranje procesa ketogeneze. Ukoliko je mobilizacija masnih kiselina iz depoa mastii intenzivnija nego što su metaboličke mogućnosti ćelija jetre, posledice toga su zamašćenje jetre i ketožno stanje. U ovakvim uslovima narušeni metabolički status može dodatno da se pogorša niskom insulinemijom, koja je jedan od mehanizama prilagođavanja organizma na negativan bilans energije na početku laktacije (Hayirli, 2006). Niska insulinemija traje sve dotle dok životinje ne uspostave energetsku ravnotežu, a to je najčešće 6-8 nedelja posle teljenja. Snižena koncentracija insulina u peripartalnom periodu predstavlja posebnu opasnost kod gojaznih životinja zbog mogućnosti intenziviranja procesa lipomobilizacije, koji u nekim slučajevima poprima nekontrolisane razmere. Posledice su najčešće difuzno zamašćenje jetre, intoksikacija organizma i nastajanje komatoznog stanja (Contreras i sar., 2010). Životinje mogu da prebrode metaboličku kruz u ako se glukoneogeneza stimuliše egzogenim ili endogenim putem. Najpovoljnije je 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). Jedinjenja koja mogu da doprinose glukoneogenezi su glicerol, propilen-glikol i natrijum-propionat (Sauer i sar., 1973; Grummer, 2008). 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. U poslednje vreme se preparati koji sadrže glicerol ili propilen-glikol sve više preporučuju kao dodaci u ishrani visokomlečnih krava u peripartalnom periodu dok se ne uspostavi energetska ravnoteža (Šamanc i sar., 2008). Ustanovljeno je da krave čija je proizvodnja do 30 litara mleka na dan, postižu energetsku ravnotežu do polovine avansnog perioda (Šamanc, 2010b). Zbog toga je najpravilniji put za ublažavanje posledica negativnog bilansa energije na početku laktacije korišćenje jedinjenja koja predstavljaju glukogenoplastične i energetske prekure.

zore. Njihovo korišćenje treba da sprečava nekontrolisanu mobilizaciju masti iz telesnih depoa i nastajanje zamašćenja jetre i ketoznog stanja koji dovode do smanjene proizvodnje mleka i poremećaja u reprodukciji (Van Knegsel i sar., 2007a; Castañeda-Gutiérrez i sar., 2009).

Cilj istraživanja izloženog u ovom radu je bio da se utvrdi uticaj energetskog dodatka na bazi propilen-glikola ("OSIMOL") dodatog u hranu visoko-mlečnih krava u peripartalnom periodu na vrednosti parametara metaboličkog profila.

Materijal i metode rada / Material and methods

Na farmi krava holštajn-frizijske rase odabrano je 40 krava u fazi zasušenja, 15 dana pre očekivanog termina teljenja. Krave su držane u veznom sistemu držanja u štalama zatvorenog tipa. Hranjene su obročno 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 periodu zasušenja, tako i posle teljenja u ranoj laktaciji.

Krave odabrane za ova ispitivanja su 15 dana pre očekivanog termina teljenja podeljene u dve grupe: kontrolnu ($n=20$) i oglednu ($n=20$). Kravama ogledne grupe je poslednje dve nedelje graviditeta i tokom prvih 30 dana laktacije dodavan u hranu preparat na bazi propilen-glikola („OSIMOL“, Veyx-Pharma GmbH, Nemačka) u količini od 200 g dnevno. Preparat je u hranu dodavan ručno uz obrok, tako što je po 100 g mešano u 900 g mekinja. Uzorci krvi su uzimani punkcijom repne vene prvi put 15 dana pre očekivanog termina teljenja, odnosno pre početka tretmana, i 10 dana nakon teljenja. Uzorci krvi za analizu su uzimani pre podne, tj. oko 4 do 5 sati nakon davanja jutarnjeg obroka. Neposredno nakon uzorkovanja krvi, u uzorcima pune krvi, određivana je koncentracija glukoze i β -hidroksi-buterne kiseline (BHBA) komercijalnim test trakama (Precision Xceed). U uzorcima krvnih seruma su određivane koncentracije ukupnih proteina, bilirubina, ureje i albumina komercijalnim test paketima (Bioanalitika, Beograd).

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

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Vrednosti pojedinih parametara metaboličkog profila krava u poslednjoj fazi graviditeta prikazani su u tabeli 1 i 2.

Iz rezultata prikazanih u tabelama 1 i 2 zapaža se da su prosečne koncentracije glukoze, BHBA, ukupnog bilirubina i ureje u krvnom serumu krava kontrolne i ogledne grupe bile u opsegu fizioloških vrednosti za goveda, kao i da nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima ovih parametara između ogledne i kontrolne grupe. Kod obe grupe krava pre teljenja su utvrđene hiperproteinemija i hiperalbuminemija, jer su vrednosti za koncentracije ukupnih proteina i albumina

bile veće od fizioloških vrednosti. Vrednosti proteinemije i albuminemije se nisu značajno razlikovale između dve grupe.

Tabela 1. *Parametri metaboličkog profila kontrolne grupe krava u visokom graviditetu /*
Table 1. Parameters of metabolic profile for control group of cows in advanced gravidity

| | Kontrolna grupa krava / Control group of cows | | | | | |
|-------|---|------------------|--|-------------------------------|--|----------------------------|
| | Glukoza / Glucose (mmol/L) | BHBA (mmol/L) | Ukupni protein / Total proteins (g/L) | Albumin / Albumin (g/L) | Ukupni bilirubin / Total bilirubin (μ mol/L) | Urea / Urea (mmol/L) |
| X | 2,92 | 0,48 | 93,67 | 45,43 | 6,61 | 2,60 |
| SD | 0,34 | 0,17 | 5,74 | 8,72 | 2,35 | 1,27 |
| SE | 0,07 | 0,04 | 1,28 | 1,95 | 0,53 | 0,28 |
| CV(%) | 11,64 | 35,42 | 6,13 | 19,19 | 35,55 | 48,85 |
| IV | 2,3-3,6 | 0,2-0,8 | 86,4-106 | 35,9-65,7 | 1,9-9,8 | 1,0-5 |

Tabela 2. *Parametri metaboličkog profila ogledne grupe krava u visokom graviditetu /*
Table 2. Parameters of metabolic profile for experimental group of cows in advanced gravidity

| | Ogledna grupa krava / Experimental group of cows | | | | | |
|-------|--|------------------|--|-------------------------------|--|----------------------------|
| | Glukoza / Glucose (mmol/L) | BHBA (mmol/L) | Ukupni protein / Total proteins (g/L) | Albumin / Albumin (g/L) | Ukupni bilirubin / Total bilirubin (μ mol/L) | Urea / Urea (mmol/L) |
| X | 2,77 | 0,53 | 95,63 | 51,51 | 5,29 | 3,00 |
| SD | 0,3 | 0,11 | 8,95 | 11,45 | 1,78 | 1,08 |
| SE | 0,07 | 0,02 | 2 | 2,56 | 0,39 | 0,24 |
| CV(%) | 10,83 | 20,75 | 9,36 | 22,23 | 33,65 | 36 |
| IV | 2,1-3,2 | 0,4-0,7 | 86,4-118,5 | 36,2-70,0 | 1,9-7,8 | 1,0-5,0 |

Vrednosti parametara metaboličkog profila krava 10 dana nakon teljenja prikazane su u tabeli 3 i 4.

Tabela 3. *Parametri metaboličkog profila kontrolne grupe krava posle teljenja /*
Table 3. Parameters of metabolic profile for control group of cows following partus

| | Kontrolna grupa krava / Control group of cows | | | | | |
|-------|---|------------------|--|-------------------------------|--|----------------------------|
| | Glukoza / Glucose (mmol/L) | BHBA (mmol/L) | Ukupni protein / Total proteins (g/L) | Albumin / Albumin (g/L) | Ukupni bilirubin / Total bilirubin (μ mol/L) | Urea / Urea (mmol/L) |
| X | 1,93 | 0,88 | 95,83 | 43,22 | 10,19 | 2,53 |
| SD | 0,43 | 0,39 | 9,71 | 11,57 | 5,16 | 0,97 |
| SE | 0,09 | 0,09 | 2,17 | 2,59 | 1,15 | 0,22 |
| CV(%) | 22,28 | 44,32 | 10,13 | 26,77 | 50,64 | 38,34 |
| IV | 1,1-2,9 | 0,4-2,1 | 84,1-120,4 | 29,6-67,5 | 3,9-23,5 | 1,0-4,0 |

**Tabela 4. Parametri metaboličkog profila ogledne grupe krava posle teljenja /
Table 4. Parameters of metabolic profile for experimental group of cows following partus**

| | Ogledna grupa krava / Experimental group of cows | | | | | |
|-------|--|------------------|--|-------------------------------|--|----------------------------|
| | Glukoza / Glucose (mmol/L) | BHBA (mmol/L) | Ukupni protein / Total proteins (g/L) | Albumin / Albumin (g/L) | Ukupni bilirubin / Total bilirubin (μmol/L) | Urea / Urea (mmol/L) |
| X | 3,13*** | 0,40*** | 75,80*** | 35,10** | 4,09*** | 2,90 |
| SD | 0,33 | 0,12 | 6,68 | 5,98 | 1,42 | 0,79 |
| SE | 0,07 | 0,03 | 1,49 | 1,34 | 0,32 | 0,18 |
| CV(%) | 10,54 | 30 | 8,81 | 17,04 | 34,72 | 27,24 |
| IV | 2,3-3,8 | 0,2-0,6 | 66,0-88,0 | 20,0-43,8 | 1,9-5,9 | 1,0-4,0 |

**p<0,01 u odnosu na isti parametar kod kontrolne grupe krava;

***p<0,001 u odnosu na isti parametar kod kontrolne grupe krava

**p<0,01 against same parameter in control group of cows;

***p <0,001 against same parameter in control group of cows

Iz tabela 3 i 4 se zapaža da je postpartalno kod krava kontrolne grupe postojala hipoglikemija, jer je prosečna koncentracija glukoze iznosila $1,93 \pm 0,43$ mmol/l, dok je kod krava ogledne grupe glikemija bila na gornjoj fiziološkoj granici ($x=3,13 \pm 0,33$ mmol/l) i značajno veća nego kod krava kontrolne grupe ($p<0,001$). Takođe se zapaža da je koncentracija BHBA u krvi krava koje su dobijale "OSIMOL" bila u okviru fizioloških vrednosti ($x=0,40 \pm 0,12$ mmol/l), dok je kod krava kontrolne grupe bila značajno veća ($p<0,001$) i prosečno je iznosila $0,88 \pm 0,39$ mmol/l. Opšte je poznato da kod visokomlečnih krava postoji stalna opasnost od poremećaja metabolizma koje pre svega karakteriše smanjivanje intenziteta glukoneogeneze i intenziviranje procesa ketogeneze (Bauman i Currie, 1980; Bell 1995; Drackley, 1999; Mulligan i Doherty, 2008). Imajući u vidu da se krave na početku laktacije nalaze u stanju negativnog bilansa energije, suplementacija obroka, energetskim i glukogenoplastičnim jedinjenjima, omogućava blagovremeno i efikasno prilagođavanje na visoku proizvodnju mleka. Danas se sa uspehom u ishrani visokomlečnih krava koriste dodaci koji u svom sastavu sadrže propilen-glikol i glicerol (Šamanc, 2010a). Rezultati ispitivanja u ovom radu pokazuju povoljan uticaj primjenjenog energetskog dodatka na dva najvažnija metabolička procesa kod preživara, glukoneogenezu i ketogenezu. Do takvih rezultata došli su i drugi autori (Moallem i sar., 2007; Šamanc i sar., 2008; Castañeda-Gutiérrez i sar., 2009). Rezultati dobijeni za koncentraciju glukoze i BHBA kod kontrolne odnosno ogledne grupe krava jasno su pokazali da se kod krava kontrolne grupe u većoj meri koriste telesne rezerve masti kao izvor energije. Zbog toga je kod njih došlo do intenziviranja procesa ketogeneze (Stamatović i sar. 1983; Heitman i sar., 1987; Holtenius i Holtenius, 1996). Poznata je činjenica da se, zbog pojačanog priliva masnih kiselina u jetru, jedan deo proizvoda

njihovog katabolizma koristi u procesu ketogeneze i time povećava opasnost za nastajanje ketoznog stanja (Heitmann i sar., 1987; Holtenius i Holtenius, 1996). Pojačan priliv masti u hepatocite kontrolne grupe krava doveo je do dodatnog opterećenja hepatocita i olakšao mogućnost nastajanja masne jetre. Kod krava u peripartalnom periodu, zamašćenje jetre, kao veoma čest nalaz nastaje zbog pojačane pa i nekontrolisane lipomobilizacije (Bobe i sar., 2004). Naši rezultati su pokazali da je kod krava tretiranih propilen-glikolom u obliku preparata "OSIMOL", prosečna koncentracija ukupnog bilirubina bila u granicama fizioloških vrednosti ($x=4,09\pm1,42 \mu\text{mol/L}$), dok je kod krava kontrolne grupe bila veća od fiziološke vrednosti ($x=10,19\pm5,16 \mu\text{mol/L}$). Razlika je bila statistički značajna ($p<0,05$). Razmatranjem pojedinačnih vrednosti ustanovljeno je da je kod 38 % tek oteljenih krava kontrolne grupe bilirubinemija bila značajno veća od fiziološke vrednosti odnosno u rasponu od 13,9 do 23,5 $\mu\text{mol/L}$. Ni kod jedne krave ogledne grupe vrednost bilirubinemije nije bila veća od fiziološke vrednosti. Kao što je poznato, koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu krava se smatra jednim od najsigurnijih pokazatelja funkcionalnog stanja jetre (Hidiroglou i Veira, 1982; Šamanc i sar. 1992). Po svemu sudeći, kod krava kontrolne grupe u periodu oko teljenja mobilizacija masti iz telesnih rezervi je bila intenzivnija nego kod krava ogledne grupe, što je zbog zamašćenja dovelo i do smanjenja funkcionalne aktivnosti ćelija jetre. Kao posledica toga, smanjila se glukoneogenetska aktivnost hepatocita (hipoglikemija) i intenzivirao se proces ketogeneze (hiperketonemija).

Veoma je interesantno da su kod krava ogledne grupe vrednosti proteinemije i albuminemije u ovoj fazi ispitivanja bile u fiziološkim granicama i iznosile su $75,80\pm6,68 \text{ g/L}$, odnosno $35,10\pm5,98 \text{ g/L}$. To nije bio slučaj kod krava kontrolne grupe kod kojih je postpartalno proteinemija bila $95,83\pm9,71 \text{ g/L}$, a albuminemija $43,22 \pm 11,57 \text{ g/l}$. Visoka vrednost proteinemije kod ogledne i kontrolne grupe krava u visokom graviditetu, kao i kontrolne grupe krava u ranom puerperiju može se objasniti većim stepenom dehidratacije u periodu oko teljenja (Little i sar., 1984). Međutim, kod krava tretiranih preparatom na bazi propilen-glikola ("OSIMOL") na kraju ogleda (rani puerperijum) koncentracija ukupnih proteina je bila u granicama fizioloških vrednosti. Po svemu sudeći osim hemokoncentracije i drugi činioci imaju ulogu u nastajanju hiperproteinemije. Između krava kontrolne i ogledne grupe, jedna od suštinskih razlika je bio njihov energetski status. Krave kontrolne grupe koje nisu dobijale energetski dodatak su imale izraženiji negativan bilans energije i u vezi sa tim, niži stepen aktivnosti štitaste žlezde. Postoje podaci koji ukazuju na to da je stepen aktivnosti tireoidee u korelaciji sa energetskim statusom životinja i da u ranoj fazi laktacije njena smanjena aktivnost predstavlja način prilagođavanja životinja na negativan bilans energije (Van Knegsel i sar., 2007b). U takvim slučajevima je koncentracija ukupnih proteina i albumina veća od fizioloških vrednosti (Williams, 2007).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da davanje krvama propilen-glikola (OSIMOL) u odgovarajućim dozama dve nedelje pre i u periodu do 30 dana posle teljenja ima povoljan uticaj na održavanje fizioloških vrednosti metaboličkih parametara u peripartalnom periodu, u kome je životinja najpodložnija metaboličkim poremećajima, koji dovode do ozbiljnih zdravstvenih poremećaja praćenih smanjenom produktivnošću životinja. Energetski dodatak ima stimulativni uticaj na proizvodnju mleka do uspostavljanja energetske ravnoteže.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je delom finansiran iz sredstava Projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj 31003 pod nazivom: „Razvoj proizvoda na bazi mineralnih i organskih sirovina u cilju proizvodnje bezbedne hrane, održivog razvoja i zaštite životne sredine“

The research was partly financed by Project No. 31003 entitled: Development of products based on mineral and organic raw materials aimed at the production of safe food, tenable development and environmental protection of the Serbian Ministry for Science and Technology.

Literatura / References

1. Bauman DE, Currie W. Partition of nutrients during pregnancy and lactation, a review of mechanisms involving homeostasis and homeoresis. *J Dairy Sci* 1980; 63: 1514-29.
2. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci* 1995; 73: 2804-19.
3. Bobe G, Young JW, Beitz DC. Invited review: etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3105-24.
4. Castañeda-Gutiérrez E, Pelton SH, Gilbert RO, Butler WR. Effect of peripartum dietary energy supplementation on dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables. *J Dairy Sci* 2009; 112: 301-15.
5. Contreras GA, O'Boyle NJ, Herdt TH, Sordillo LM. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J Dairy Sci* 2010; 93: 2508-16.
6. Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci* 1999; 82: 2259-73.
7. Grummer RR, Witbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev* 2010; 56 Suppl: 22-8.
8. Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J* 2008; 176: 10-20.
9. Hayirli A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun* 2006; 30: 749-74.
10. Heitmann RN, Dawes DJ, Sensenig SC. Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. *J Nutr* 1987; 117: 1174-80.

11. Hidiroglou M, Veira DM. Plasma amino acid levels in the fat cow syndrome. Ann Rech Vet 1982; 13: 111-5.
12. Holtnius P, Holtenius K. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. Zentralbl Veterinarmed A 1996; 43: 579-87.
13. Little W, Sansom BF, Manston R, Allen WM. Importance of water for the health and productivity of the dairy cows. Res Vet Sci 1984; 37: 283-9.
14. Moallem U, Katz M, Arieli A, Lehrer H. Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90: 3846-56.
15. Mulligan FJ, Doherty ML. Production diseases of the transition cows. Vet J 2008; 176: 3-9.
16. Sauer FD, Erfle JD, Fischer JL. Propylene-glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows and evaluation of blood metabolic parameters. Can J Animal Sci 1973; 53: 265-71.
17. Stamatović S, Šamanc H, Jovanović M. Prilog izučavanja glikemije i ketonurije u goveda holštajnske rase. Vet Glasnik, 1983; 37: 89-93.
18. Šamanc H, Janković D, Damnjanović Z, Marković S, Maksimović A. Primena lekova "Frugliksil" i "Hepafarm" u lečenju ketoze krava. Vet Glasnik 1992; 46: 393-9.
19. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Vujanac I, Prodanović R, Kuruc A, Pudlo P. Mogućnost preveniranja masne jetre u peripartalnom periodu. Vet Glasnik 2008; 62: 13-24.
20. Šamanc H. Bolesti organa za varenje goveda. 1. izd. Beograd: Naučna KMD, 2010a.
21. Šamanc H, Kirovski D, Adamović M, Vujanac I, Prodanović R, Radivojević M, Nikić D, Tulcan C, 2010, Uticaj dodavanja energetskog dodatka u hrani na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate visokomlečnih krava, Vet glasnik, 64, 197-206.
22. Van Knegsel AT, Van den Brand H, Dijkstra J, Van Straalen WM, Jorristma R, Tamminga S, Kemp B. Effect of glucogenic vs. Lipogenic diets on energy balance, blood metabolites, and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation. J Dairy Sci 2007a; 90: 3397-409.
23. Van Knegsel AT, Van den Brand H, Graat EA, Dijkstra J, Jorristma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. J Dairy Sci 2007b; 90: 1477-85.
24. Williams RS. Textbook of Endocrinology. 10th rev. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, 2007.

ENGLISH

INFLUENCE OF PERIPARTUM DIETARY ENERGY SUPPLEMENTATION ON SOME BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETARS IN DAIRY COWS

**Slavica Bojković-Kovačević, I. Jeremić, Danijela Kirovski, M. Polovina,
S. Milošević, I. Vujanac, R. Prodanović**

The aim of this study was to determine the influence of an energy supplement on the basis of propylene glycol on the values of metabolic profile parameters in periparturient cows. Fifteen days before calving, 40 cows were selected and divided into two

groups: control ($n=20$) and experimental ($n=20$). From day 15 before to day 30 after calving, the experimental group of cows received an energy supplement based on propylene-glycol added in food ("OSIMOL", Veyx-Pharma GmbH, Germany). Blood samples were taken 15 days before and 10 days after calving. Concentrations of glucose and beta-hydroxy-butyric acid (BHBA) were determined immediately after blood was taken. Concentrations of total protein, albumin, urea and total bilirubin were determined in the blood serum. There was no significant difference in the average values of the measured parameters between the control and the experimental group of cows. After parturition glycemia in cows of the control group was lower than physiologically acceptable ($x=1.93\pm0.43$ mmol/L), and glucose in cows of the experimental group was at the upper physiological limit ($x=3.13\pm0.33$ mmol/L) and significantly higher ($p<0.001$) than in the control group. The concentration of BHBA in cows that received the energy supplement ("OSIMOL") was 0.40 ± 0.12 mmol/L, while in the control group of cows it was significantly higher ($p<0.001$) and stood at 0.88 ± 0.39 mmol/L. Furthermore, the concentration of total bilirubin in the cows of the experimental group was within the physiological range ($x = 4.09\pm1.42$ μ mol/L), while in the cows of the control group it was significantly higher ($p<0.05$) and stood at 10.19 ± 5.16 μ mol/l.

Key words: cows, periparturient period, energy supplement, blood biochemical parameters

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ В КОРМЛЕНИИ КОРОВ В ТЕЧЕНИЕ ДОРОДОВОГО ПЕРИОДА НА СТОИМОСТИ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ

Славица Бойкович-Ковачевич, И. Еремич, Даниела Кировски, М. Половина,
С. Милошевич, И. Вуянац, Р. Проданович

Цель исследования в этой работе была утвердить влияние пропиленгликола на стоимости параметров метаболического профиля коров в дородовом периоде. Пятнадцать дней до ожиданного отёла отобрано 40 коров, разделенные в двух группах: контрольную ($n=20$) и опытную ($n=20$). Коровам в опытной группе в периоде от 15 дней перед до 30 дней после отёла в корм добавливан препарат на базе пропилен-гликола ("ОСИМОЛ", Veyx-Pharma GmbH, Германия) в дневном количестве от 200 граммов. Образчики крови взяты 15 дней до 10 дней после отёла. Непосредственно после извлечения крови, в образцах полной крови, определялась концентрация глюкозы и бета-гидрокси-бутерной кислоты (БГБК). В образцах кровяного серума определялась концентрация совокупных протеинов, альбуминов, мочевины и совокупного билирубина. В дородовом периоде, среди коров контрольной и опытной группах, не установлены значительные разницы между средними стоимостями испытываемых параметров метаболического профиля. После родов у коров контрольной группы концентрация глюкозы была ниже физиологически приемлемой ($x=1.93\pm0.43$ ммоль/л), пока у коров опытной группы гликемия была на верхней физиологической границе ($x=3.13\pm0.33$ ммоль/л) и статистически значительно более большая, чем у контрольной группы ($p<0.001$). Концентрация БГБК у коров, получавшие энергетическую добавку ("ОСИМОЛ") составляла (в сумме) 0.40 ± 0.12

ммоль/л, пока у коров контрольной группы была значительно больше ($p<0,001$) и в среднем составляла (в сумме) $0,88\pm0,39$ ммоль/л. Кроме того у коров опытной группы концентрация совокупного билирубина была в границах физиологических стоимостей ($x=4,09\pm1,42$ мкмоль/л), пока у коров контрольной группы эта стоимость была значительно больше ($p<0,05$) и составляла (в сумме) $10,19\pm5,16$ мкмоль/л.

Ключевые слова: корова, дородовой период, энергетическая добавка, биохимические параметры крови

IMUNSKI KOMPLEKSI U KRVNOM SERUMU TELADI SA KLINIČKIM SIMPTOMIMA BRONHOPNEUMONIJE*

*IMMUNE COMPLEXES IN BLOOD SERUM OF CALVES WITH
CLINICAL SYMPTOMS OF BRONCHOPNEUMONIA*

Natalija Fratrić, D. Gvozdić, Olivera Savić, Ivana Jagličić, Vesna Ilić**

Oboljenja respiratornog trakta goveda su kompleksne etiologije, a javljaju se kao posledica interakcije imunskog sistema jedinke, strešogenih činilaca prisutnih u spoljašnjoj sredini i patogenih mikroorganizama. Nivo i uloga cirkulišućih imunskih kompleksa u serumima teladi obolelih od ove bolesti do sada nisu izučavani. Ovaj rad je urađen sa ciljem da se utvrди da li su bolesti respiratornog trakta kod teladi u uzrastu od tri meseca praćene promenom nivoa imunskih kompleksa u serumu i promenom nivoa serumskih proteina, pre svega γ -globulina, kao osnovnih konstituenata imunskih kompleksa. Imunski kompleksi iz serumu teladi su izolovani precipitacijom polietilen glikolom (PEG-om). Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa je određivan merenjem optičke gustine PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}). OD_{350} PEG precipitata obolele teladi je iznosila $0,577 \pm 0,206$ i bila je statistički značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednosti dobijene kod zdrave teladi ($OD_{350} = 0,286 \pm 0,080$). U γ -globulinskoj frakciji serumu i PEG precipitata i zdrave i obolele teladi bili su prisutni i spori, katjonski, i brzi, anjonski γ -globulini, ali je koncentracija brzih γ -globulina bila značajno niža kod obolele teladi. Nivo ukupnih γ -globulina i γ -globulinskih frakcija nije statistički značajno korelirao sa nivoom PEG precipitabilnih imunskih kompleksa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u serumima tri meseca starih teladi obolelih od bolesti respiratornog trakta detektuje povećan nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa.

* Rad primljen za štampu 01. 11. 2010. godine

** Dr sci vet. med. Natalija Fratrić, vanredni profesor, dr sci. vet. med. Dragan Gvozdić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. Olivera Savić, dr med. Ivana Jagličić, specijalista imunologije, Institut za transfuziju krvi Srbije; dr med. Vesna Ilić, viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

sa, a rezultati dobijeni ovim relativno jednostavnim testom mogu se koristiti kao dodatni parametar za dijagnozu i praćenje toka bolesti.

Ključne reči: telad, bolesti respiratornog trakta, PEG esej, imunski kompleksi, γ -globulini

Uvod / Introduction

Oboljenja respiratornog trakta goveda su najčešći uzrok morbiditeta i mortalitetu u intenzivnom govedarsvu. Fibroza i gubitak funkcionalnog kapaciteta pluća kod životinja sa preležanom pneumonijom imaju negativan uticaj na prirast, a kod priplodnih grla koja se koriste za obnovu stada produžava se vreme do prvog teljenja. Ova oboljenja su uzrok velikih ekonomskih gubitaka na govedarskim farmama (Ames i sar., 1997; Snowder i sar., 2006), jer smrtnost može da dostigne nivo i od 25% i zajedno sa cenom tretmana obolelih životinja povećava troškove proizvodnje za više od 8%.

Pneumonija teladi je bolest kompleksne etiologije i posledica je interakcije između jedinke, sredine i patogenih mikroorganizama (Van Donkersgoed i sar., 1993). Brojni patogeni su uključeni u izazivanje akutne ili hronične forme pneumonije (virusi: govedi herpes virus-1 (BHV-1), *Parainfluenza-3* (PI3), *Bovine Respiratory Syntytial Virus* (BRSV), *Bovine Virus Diarrhea* (BVD); mikoplazme; bakterije: *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*) (Srikumaran i sar., 2007; Czuprynski, 2009). Smatra se da interakcija između virusnih i bakterijskih patogena i njihova obostrana interakcija sa leukocitima i endotelnim i epitelnim ćelijama domaćina uzrokuje snažnu zapaljensku reakciju (fibrinoznu pleuropneumoniju) karakterističnu za oboljenja respiratornog trakta goveda (Czuprynski, 2009). Različiti faktori mogu uticati na prijemčivost teladi prema patogenima koji su uzročnici pneumonije. Istovremeno prisustvo bolesti, stres ili neadekvatan pasivan transfer kolostralnih imunoglouolina G (IgG) (kao posledica nedovoljno kvalitetnog kolostruma) smanjuju mogućnost efikasnog imunskog odgovora. Mešanje teladi različite starosti i različitog porekla u istom prostoru, kao i smeštaj teladi u slabo ventilirane, prenaseljene i vlažne uslove potencira nastajanje respiratornih bolesti. Iako pneumonija kod teladi može da se javi u bilo koje doba godine, najčešće se javlja zimi i u proleće, od oktobra do decembra i od februara do maja.

Razlog za virusno-bakterijski sinergizam u ovoj bolesti nije poznat, kao što u potpunosti nije poznat ni način na koji se imuni sistem teladi (ne)bori protiv ovih patogena. Kod ljudi imunski kompleksi su povišeni u bakterijskim pneumonijama (Korppi i sar., 2008; Holloway i sar., 1993; Mellencamp i sar., 1987) i oni imaju udela u oštećenju tkiva pluća aktivacijom sistema komplementa i neutrofila. Podaci o nivou i sastavu imunskih kompleksa u krvnom serumu teladi sa oboljenjima respiratornih organa su retki (Fratrić i sar., 2010a). Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi nivo i karakteristike imunskih kompleksa u serumima teladi u uzrastu od tri meseca sa oboljenjem respiratornog trakta u cilju dobijanja dodatnog dijagnostičkog kriterijuma kod ove bolesti.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Za ocenjivanje stanja respiratornog sistema korišćen je respiratorni bodovni (skoring) sistem, sličan onom koji je ustanovio McGuirk SM (2005). Respiratori skoring sistem se sastoji od kliničkih znakova koji se ocenjuju (kriterijuma): pojava i količina iscetka iz nosa, iscedak iz oka, položaj ušiju, rektalna temperatura, kašalj (spontani ili indukovani), broj respiracija. Svaki od kriterijuma je ocenjivan brojevima od 0 do 3, gde je veća vrednost ukazivala na veću težinu i ozbiljnost bolesti: 0 - normalan; 1 - blag; 2 - umeren; 3 - ozbiljan. Ukupan respiratori skor se ocenjuje kao normalan ako je manji od 4. Vrednost respiratornog skora od 4 zahteva praćenje životinje, a vrednost viša od 4 zahteva tretman (antibioticima). U studiju je bilo uključeno 14 teladi uzrasta od tri meseca, sa znacima oboljenja respiratornog trakta, pre početka terapije. Kontrolnu grupu je činilo 11 zdravih taladi iste starosti.

Uzorci krvi su uzimani punkcijom vene jugularis. Serum je izolovan nakon spontane koagulacije krvi na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 10 min na 3000 rpm. Krv uzeta sa heparinom kao antikoagulansom je korišćena za određivanje vrednosti hematoloških parametara.

Imunokompleksi (IC) iz seruma zdravih teladi i teladi sa pneumonijom izolovani su precipitacijom polietilen glikolom (PEG-om) (Fratrić i sar., 2006). Nivo imunskih kompleksa određivan je merenjem opitčke gustine PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}).

U serumima i PEG precipitatima određivana je koncentracija ukupnih proteina BCA esejem (Pierce, SAD).

Elektroforeza u gelu agaroze je izvođena u gelu 1% agaroze po mjeri koju je opisao Johansson (1972), a procenat i koncentracija γ -globulina određivana je denzitometrijskom analizom elektroforezograma uz pomoć Image Master TotalLab softvera (GE HealtCare LifeScience, SAD).

Broj leukocita, eritrocita, hematokritska vrednost, koncentracija hemoglobina, MCV, MCH, MCHC, i broj trombocita su određivani na automatskom brojaču ćelija podešenom za brojanje životinjskih ćelija (Hematology Analyzer, 901062, Diatron, Arcus, GmbH, Wien, Austria).

U cilju identifikovanja bakterija uziman je bris iz nosa obolelih i zdravih životinja, a ispitivanja su izvršena primenom konvencionalnih bakterioloških metoda kao i automatskog identifikacionog sistema (BBL Cristal Enteric/nonfermenter ID kit, Becton Dickinson).

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunata je srednja vrednost i standardna devijacija. Za ocenu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti primenjen je Studentov t-test gde je vrednost verovatnoće (p) manja od 0,05 označena kao statistički značajna. Linearnom regresionom analizom ispitivana je korelacija nivoa imunskih kompleksa sa koncentracijom serumskih proteinskih frakcija.

Rezultati / Results

Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u serumima teladi sa kliničkim simptomima bronhopneumonije / Level of PEG precipitable immune complexes in serums of calves with clinical symptoms of bronchopneumonia

Nivo imunskih kompleksa u serumima teladi sa kliničkim simptomima, izražen kao optička gustina PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}) iznosio je $0,577 \pm 0,206$ i bio statistički značajno viši ($p = 2 \times 10^{-4}$) u odnosu na nivo imunskih kompleksa u serumima zdrave teladi $0,286 \pm 0,089$ (tabela 1).

Tabela 1. Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u krvnom serumu zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /

Table 1. Level of PEG precipitable complexes in blood serum of healthy calves and calves with respiratory tract disease

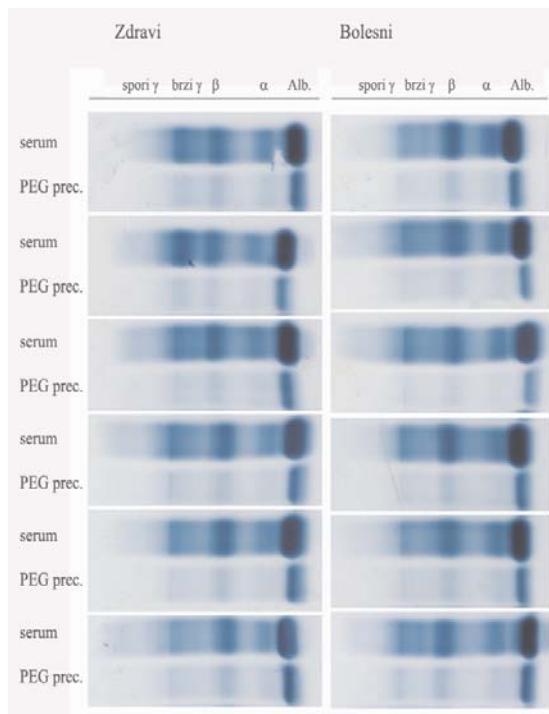
| | OD ₃₅₀ PEG precipitata / OD ₃₅₀ of PEG precipitate | |
|--------|---|----------------------------------|
| | Bolesna telad / Diseased calves | Zdrava telad / Healthy calves |
| 1 | 0,570 | 0,381 |
| 2 | 0,496 | 0,195 |
| 3 | 0,681 | 0,297 |
| 4 | 0,393 | 0,198 |
| 5 | 0,981 | 0,120 |
| 6 | 0,397 | 0,218 |
| 7 | 0,466 | 0,369 |
| 8 | 0,730 | 0,329 |
| 9 | 0,550 | 0,303 |
| 10 | 0,921 | 0,368 |
| 11 | 0,244 | 0,366 |
| 12 | 0,700 | |
| 13 | 0,451 | |
| 14 | 0,492 | |
| x ± SD | 0,577 ± 0,206* | 0,286 ± 0,089 |

* $p = 2 \times 10^{-4}$

Elektroforetske karakteristike proteina krvnog seruma i PEG precipitata teladi sa bronhopneumonijom / Electrophoretic characteristics of blood serum proteins and PEG precipitates of calves with bronchopneumonia

U serumima i PEG precipitatima zdrave i obolele teladi uočavaju se četiri glavne elektroforetske frakcije: γ , β i α -globulini i albumini (slika 1). Elektroforetske karakteristike (elektroforetska pokretljivost i pojava elektroforetski ho-

mogenijih zona) ovih frakcija u serumima i PEG precipitatima kod obolele teladi nisu bile izmenjenje u odnosu na zdravu telad. U γ -globulinskoj frakciji seruma i PEG precipitata i zdrave i obolele teladi bili su prisutni spori, katjonski, i brzi, anjonski, γ -globulini.



Slika 1. Elektroforeza seruma i PEG precipitata zdrave teladi i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /

Figure 1. Electrophoresis of serums and PEG precipitates of healthy calves and calves with respiratory tract disease

Na osnovu denzitometrijske analize elektroforezograma i ukupne koncentracije proteina u serumima i PEG precipitatima određena je koncentracija proteina u svakoj elektroforetskoj frakciji (tabela 2). U serumima obolele teladi je izmereno statistički značajno smanjenje koncentracije brzih γ -globulina. U serumima i u PEG precipitatima obolele teladi nivo α -globuina bio je povišen dok je nivo albumina bio značajno niži.

Nivo ukupnih γ -globulina i γ -globulinskih frakcija nije statistički značajno korelirao sa nivoom PEG precipitabilnih imunskih kompleksa.

Tabela 2. Nivo ukupnih proteinâ, γ , β , α -globulina i albumina u krvnom serumu i PEG precipitatima tri meseca stare zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /
 Table 2. Level of total proteins, γ , β , α globulina and albumin in blood serum and PEG precipitates of three-month-old healthy calves and calves with respiratory tract disease

| (g/L) | Serumi / Serums | | | PEG precipitati / PEG precipitates | | |
|--|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | Zdrava telad / Healthy calves | Bolesna telad / Diseased calves | Verovatnoća / Probability (p) | Zdrava telad / Healthy calves | Bolesna telad / Diseased calves | Verovatnoća / Probability (p) |
| Ukupni proteini / <i>Total proteins</i> | 62 ± 5 | 58 ± 6 | 0,147 | 4,6 ± 0,4 | 4,4 ± 0,9 | 0,387 |
| Ukupni γ -globulini / <i>Total γ-globulins</i> | 18,8 ± 3,3 | 16,4 ± 4,5 | 0,139 | 0,9 ± 0,3 | 0,9 ± 0,5 | 0,964 |
| Spori γ -globulini / <i>Slow γ-globulins</i> | 8,5 ± 2,0 | 7,7 ± 3,1 | 0,463 | 0,3 ± 0,2 | 0,4 ± 0,3 | 0,581 |
| Brzi γ -globulini / <i>Fast γ-globulins</i> | 10,3 ± 1,8 | 8,5 ± 1,8 | 0,028 | 0,5 ± 0,2 | 0,5 ± 0,3 | 0,443 |
| β -globulini / β -globulins | 14,8 ± 3,1 | 15,6 ± 3,8 | 0,389 | 0,9 ± 0,2 | 1,0 ± 0,3 | 0,169 |
| α -globulini / α -globulins | 8,4 ± 1,1 | 9,4 ± 1,1 | 0,036 | 0,5 ± 0,1 | 0,6 ± 0,2 | 0,044 |
| Albumini / <i>Albumins</i> | 18,2 ± 1,9 | 16,8 ± 1,6 | 0,001 | 2,3 ± 0,4 | 1,9 ± 0,4 | 0,002 |

*Osnovni hematološki parametri teladi sa kliničkim simptomima bronhopneumonije
Elementary haematological parameters for calves with clinical symptoms of bronchopneumonia*

Kod obolele teladi uključene u ogled broj leukocita i trombocita se nisu statistički značajno razlikovali u odnosu na zdravu telad. Parametri crvene krvne slike (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokritska vrednost) su imali statistički značajno niže vrednosti kod obolelih u odnosu na zdravu telad. Međutim, ove niže vrednosti parametara crvene krvne slike nisu za posledicu imale promenu vrednosti MCV, MCH i MCHC kod obolelih za razliku od zdrave teladi.

Tabela 3. *Osnovni hematološki parametri periferne krvi zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /*

Table 3. Elementary haematological parameters of peripheral blood of healthy calves and calves with respiratory tract disease

| | Bolesna telad / Diseased calves | Zdrava telad / Healthy calves | Verovatnoća / Probability (p) |
|--|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Leukociti / Leukocytes ($\times 10^9/L$) | $12,67 \pm 5,04$ | $10,52 \pm 1,98$ | 0,233 |
| Eritrociti / Erythrocytes ($\times 10^{12}/L$) | $10,48 \pm 3,13$ | $13,39 \pm 2,07$ | 0,031 |
| Hemoglobin / Haemoglobin (g/L) | 90 ± 11 | 106 ± 15 | 0,028 |
| Hematokrit / Heamatocrit (%) | $30,1 \pm 6,7$ | $38,5 \pm 5,4$ | 0,009 |
| MCV (fl) | $29,9 \pm 5,5$ | $28,9 \pm 3,0$ | 0,636 |
| MCH (pg) | $9,5 \pm 3,8$ | $8,0 \pm 0,8$ | 0,232 |
| MCHC (g/L) | 311 ± 63 | 275 ± 3 | 0,090 |
| Trombociti / Thrombocytes ($\times 10^9$) | 1018 ± 189 | 893 ± 233 | 0,261 |

Identifikacija bakterija / Identification of bacteria. Kod sve obolele teladi iz nosnih briseva izolovana je *Pasteurella multocida*.

Diskusija / Discussion

Iako oboljenja respiratornog sistema goveda danas predstavljaju najveći zdravstveni problem u govedarstvu, kompletan mehanizam koji objašnjava nastanak ove bolesti, tj način na koji virusni i bakterijski agensi probijaju imunsku odbranu domaćina nisu u potpunosti poznati. Smatra se da su virusi primarni uzročnici bolesti i da aktivna virusna infekcija u bronhijalnim epitelnim ćelijama dovodi do oslobođanja hemokina i citokina koji privlače, aktiviraju i povećavaju adhezivnost neutrofila, što sve dovodi do primarne zapaljenske reakcije. Osim povećane adherence neutrofila, primarna virusna infekcija stvara uslove za sekundarnu bakterijsku infekciju jer dovodi do povećanja adhezivnosti bakterija za bronhijalne epitelne ćelije u uslovima kada je snažan inflamatori odgovor već

započet. Bakterije se razmnožavaju u plućima i oslobađaju egzotoksine. Oni u niskoj koncentraciji aktiviraju neutrofile i mononuklearne fagocite koji nakon toga oslobađaju citokone i slobodne radikale, što dodatno pogoršava stanje inflamacije. U većim koncentracijama egzotoksi indikuju i apoptozu leukocita (Czuprynski, 2009).

Uloga imunskih kompleksa, snažnih aktivatora komplementa i neutrofila (Abbas i sar., 2007), u inflamatornom odgovoru tokom oboljenja respiratornog sistema goveda nije izučavana. U ovom radu nivo imunskih kompleksa je određivan PEG precipitacionom metodom koja omogućava i kvantitativnu (Fratrić i sar., 2006) i (barem delimičnu) kvalitativnu analizu (Fratrić i sar., 2010b) cirkulišućih imunskih kompleksa teladi. Korišćenjem ovog metoda pokazano je da je u serumima teladi uzrasta od tri meseca obolelih od bolesti respiratornog trakta, nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa statistički značajno povišen. Iako je pokazano da je i kod obolele teladi stare samo mesec dana nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa povišen (Fratrić i sar., 2010a), kod ovako mlade teladi za formiranje imunskih kompleksa su predominantno odgovorni majčini, kolostralni IgG. Tek kod tri meseca, kada majčini IgG bivaju potpuno katabolisani, (Virtala i sar., 1999) možemo govoriti o sposobnosti humorarnog imuniteta teladi da odgovori na ulazak patogena stvaranjem imunskih kompleksa. PEG precipitira velike imunske komplekse ($>19S$) (Poulton i sar., 1983). Kakav je značaj ovih velikih imunskih kompleksa kod obolele teladi, nije poznato. Veliki cirkulišući imunski kompleksi se javljaju kod ljudi sa pneumonijom izazvanom pneumokokama samo kod bolesnika kod kojih nije detektovana bakteriemija, dok kod bakteriemičnih postoje samo imunski kompleksi male molekulske težine (8-19S) (Mellencamp i sar., 1987). Ovakav rezultat ukazuje na to da bi, barem kod humane populacije u slučajevima pneumonije, veliki imunski kompleksi mogli imati protektivni značaj.

U serumima obolele teladi detektovan je statistički značajan pad koncentracije brzih γ -globulina, koji predominantno sadrže IgG1 molekule. Šta je primarni uzrok smanjenja koncentracije IgG1 kod ovih životinja nije poznato, ali imajući u vidu da su sve životinje sa pneumonijom imale snižen broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina i hematokritsku vrednost, vrlo je moguće da deficit gvožđa indukuje smanjenje broja B-limfocita (Svoboda i sar., 2004). Osim toga, virusne infekcije, primarni uzročnici bolesti menjaju čelijski T odgovor od protektivnog Th1 ka neprotektivnom Th2 odgovoru (Gershwin i sar., 2005), pa postoji mogućnost da je ova promena u koncentraciji brzih γ -globulina indukovana poremećajima u citokinskoj mreži kod obolelih životinja.

Elektroforetska frakcija α -zone, koja u sebi sadrži proteine akutne faze (Putnam, 1975) je bila značajno viša u serumima i PEG precipitatima kod obolele teladi. Mikrobiološka analiza brisa nosa pokazala je prisustvo, inače normalne, komensalne bakterije gornjeg respiratornog trakta *Pasteurella multocida* kod sve obolele teladi. Visoka povezanost prisustva ovih bakterija u uzorcima traheobronhijalne lavaže sa kliničkim znacima bolesti i sa povećanom koncentracijom proteina akutne faze (Nikunen i sar., 2007) ukazuje na snažnu ulogu ove bakterije u pa-

togenezi oboljenja respiratornog trakta goveda, a u epidemijama za koje je bila odgovorna ova bakterija ili *Mannheimia haemolytica* opisana je smrtnost i do 25%. U eksperimentalno indukovanoj bolesti bakterijom *Pasteurella multocida* pokazano je da ona uzrokuje opšte simptome bolesti i povećanje koncentracije proteina akutne faze (Dowling i sar., 2002). Prisustvo antitela na virusu, koji su mogući pokretači respiratorne bolesti goveda, nije ispitivano u našoj studiji. Međutim, s obzirom na to da nije nađena korelacija između prisustva virusa, kliničkih znakova bolesti i koncentracije proteina akutne faze pretpostavlja se da virusi ne moraju da imaju predominantnu ulogu u patologiji bolesti respiratornog trakta goveda, mada naravno predstavljaju predisponirajući faktor za sekundarnu bakterijsku infekciju (Nikunen i sar., 2007). Takođe, u istoj studiji nije pokazano da postoji korelacija između nalaza prisustva *Mycoplasma* sp. i kliničkih znakova bolesti, što po mišljenju autora takođe govori da ovi mikroorganizmi nemaju predominantnu ulogu u nastanku bolesti.

Dalja istraživanja će biti usmerena na detektovanje specifičnih antitela prema identifikovanim uzročnicima pneumonije u serumima i PEG precipitatima obolele teladi i ispitivanje specifičnih strukturnih karakteristika molekula IgG u sastavu imunskih kompleksa kao pokretača efektorne grane imunskog odgovora kod ove teladi.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se povećanje nivoa imunskih kompleksa u serumima teladi uzrasta od tri meseca obolelih od bolesti respiratornog trakta može detektovati relativno jednostravnim PEG precipitacijskim testom, a dobijeni rezultati se mogu koristiti kao dodatni dijagnostički parametar. Kakav je biološki značaj ovih PEG precipitabilnih imunskih kompleksa kod teladi obolelih od pneumonije (protektivan ili proinflamatorni) ostaje da bude utvrđeno.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima projekta br. III46002 i projekta br. IO175062 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, Republike Srbije./

This research was supported by Project No. III46002 and Project No. IO175062 of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology (6th edition). Saunders, Elsevier Comp. Philadelphia, PA, 2007.
2. Ames TR. Dairy calf pneumonia. The disease and its impact. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997; 13(3): 379-91.
3. Czuprynski CJ. Host response to bovine respiratory pathogens. Anim Health Res Rev 2009; 10(2): 141-3.
4. Dowling A, Hodgson JC, Schock A, Donachie W, Eckersall PD, Mckendrick IJ. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. Res Vet Sci 2002; 73(1): 37-44.

5. Fratrić N, Milošević-Jovčić N, Ilić V, Stojić V. The levels of immune complexes in the blood sera of calves in neonatal period and adult cattle. *Acta Veterinaria Beograd* 2006; 56(2-3): 103-10.
6. Fratrić N, Ilić V, Gvozdić D, Stojić V, Manojlović M. Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u serumu mesec dana stare teladi obolele od pneumonije. *Zbornik kratkih sadržaja 15. godišnjeg savetovanje veterinara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) (sa međunarodnim učešćem)*, 09. 06. – 12. 06. 2010a. Teslić, Republika Srpska, strana 93.
7. Fratrić N, Ilić V, Milošević-Jovčić N, Stojić V. Electrophoretic an immunoelectrophoretic characteristics of IgG as a constituents of PEG precipitable immune complexes in preruminant calves' sera. *Acta Veterinaria Beograd* 2010b; 60(2-3): 155-64.
8. Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML, Corbeil LB. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107(1-2): 119-30.
9. Holloway Y, Snijder JA, Boersma WG. Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complexes in patients with community-acquired pneumonia by means of an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(12): 3247-54.
10. Johansson BG. Agarose gel electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest*, 1972, 29 (Suppl. 124), 7-9.
11. Korppi M, Leinonen M, Ruuskanen O. Pneumococcal serology in children's respiratory infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(3): 167-75.
12. McGuirk SM. Otitis media in calves. In Proc. 23rd Am Coll Vet Intern Med, Baltimore, MD, 2005, 228-30.
13. Mellencamp MA, Preheim LC, McDonald TL. Isolation and characterisation of circulating immune complexes from patients with pneumococcal pneumonia. *Infection and Immunity* 1987; 55(8): 1737-42.
14. Nikunen S, Härtel H, Orro T, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Sankari S, Aho P, Pyörälä S, Saloniemi H, Soveri T. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30(3): 143-51.
15. Poulton TA, Mooney NA, Nineham LJ, Hay FC. Characteristics of immune complexes detectable by two independent assays in gynaecological malignancies. *Clin Exp Immunol* 1983; 53(3): 573-80.
16. Putnam FW. The plasma proteins Structure, function, and genetic control. Second edition. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.
17. Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci* 2006, 84(8): 1999-2008.
18. Srikuamaran S, Kelling CL, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(2): 215-29.
19. Svoboda M, Drabek J, Krejci J, Rehakova Z, Faldyna M. Impairment of the peripheral lymphoid compartment in iron-deficient piglets. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004 51(5): 231-7.
20. Van Donkersgoed J, Ribble CS, Boyer LG, Townsend HG. Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 1993; 57(4): 247-54.

21. Virtala QMK, Grohn YT, Mechor GD, Erb HN. The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life. Preventive Veterinary Medicine 1999; 39(1): 25-37.

ENGLISH

IMMUNE COMPLEXES IN BLOOD SERUM OF CALVES WITH CLINICAL SYMPTOMS OF BRONCHOPNEUMONIA

Natalija Fratrić, D. Gvozdić, Olivera Savić, Ivana Jagličić, Vesna Ilić

Pneumonia in preruminant calves is a multifactorial disease. Infectious agents, the environment, management and the immune status of the calves are all important factors in determining the outcome of an infection. Until today, the level and composition of circulating immune complexes in preruminant calves with pneumonia have not been studied in detail.

We performed this work with the aim to determine whether pneumonia in three-month-old calves is followed by changes in the immune complex level and changes in the γ -globulin level as their possible constituents. Immune complexes from the calves' sera were isolated by polyethylene glycol (PEG) precipitation methods. Optical density at 350 nm (OD_{350}) of redissolved precipitates was measured to determine the circulating immune complexes level. The OD_{350} level of PEG precipitates of calves with pneumonia at the time of diagnosis was 0.577 ± 0.206 and it was statistically significantly higher ($p < 0.001$) than OD_{350} the level of PEG precipitates of healthy calves (0.286 ± 0.080). Electrophoretic analysis of sera and PEG precipitates showed that both slow and fast γ -globulins are found among serum and immune-complexes' γ -globulins, but the concentration of fast γ -globulins was significantly lower in sera of diseased calves. The level of PEG precipitable immune complexes was not correlated with the concentration of serum and PEG precipitable γ -globulins.

The results of this study have shown that by relatively simple PEG precipitation assay it is possible to detect an increased level of circulating immune complexes in calves with pneumonia. This can be used as an additional diagnostic parameter for the detection and follow up of the disease.

Key words: calves, bovine respiratory diseases, PEG assay, immune complexes, γ -globulins

РУССКИЙ

ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ В КРОВЯНОМ СЕРУМЕ ТЕЛЯТ С КЛИНИЧЕСКИМИ СИМПТОМАМИ БРОНХОПНЕВМОНИИ

Наталия Фратрич, Д. Гвоздич, Оливера Савич, Ивана Ягличич, Весна Илич

Заболевания респираторного тракта крупного рогатого скота суть комплексные этиологии, а являются как последствие интеракции иммунной системы

единичного животного, стрессогенных деятелей присутствующих во внешней среде и патогенных микроорганизмов. Уровень и роль циркулирующих иммунных комплексов в серумах телят заболевших этой болезнью до сих пор не изучиваны. Эта работа сделана с целью утвердить болезни респираторного тракта у телят в возрасте три месяца слежены ли изменением уровня иммунных комплексов в серуме и изменением уровня серумных протеинов, прежде всего γ глобулинов, как основных компонентов иммунных комплексов. Иммунные комплексы из серума телят изолированы преципитацией полиэтилен гликолом (ПЭГ-ом). Уровень ПЭГ преципабильных иммунных комплексов определяван измерением оптической густоты ПЭГ осадков на 350 нм (ОД_{350}). ОД_{350} ПЭГ осадков заболевших телят составляла (в сумме) $0,577 \pm 0,206$ и была статистически значительно больше ($p < 0,001$) в отношении стоимости, полученной у здоровых телят ($\text{ОД}_{350} = 2,286 \pm 0,080$). В γ глобулиновой фракции серума и ПЭГ осадков и здоровых и заболевших теля были присутствующие и медленные, катионные и быстрые анионные γ глобулины, но концентрация быстрых γ глобулинов была значительно ниже у заболевших телят. Уровень совокупных γ глобулинов и γ глобулиновых фракций не статистически значительно коррелировал с уровнем ПЭГ преципабильных иммунных комплексов. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в серумах телят им три месяца заболевших болезнью респираторного тракта детектируется увеличенный уровень ПЭГ преципабильных иммунных комплексов, а результаты, полученные этим релятивно простым тестом могут пользоваться как дополнительный параметр для диагноза и слежки течения болезни.

Ключевые слова: телята, болезни респираторного тракта, ПЭГ эссе, иммунные комплексы, γ глобулины

NONSPECIFIC DEFENSE MECHANISMS IN DOGS DURING EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL INFECTION*

NESPECIFIČNI ODBRAMBENI MEHANIZMI KOD PASA U TOKU EKSPERIMENTALNE INFEKCIJE STAFILOKOKAMA

Maria Andonova, Dimitritchka Dimitrova, I. Borissov**

*The aim of our study was to evaluate nonspecific defence mechanisms (phagocytosis and acute phase response) in dogs during an experimental infection caused by subcutaneous application of *Staphylococcus aureus* (1×10^8 CFU/mL). The neutrophils phagocytosis (evaluated by fluorescein isothiocyanate labeled *Staphylococcus aureus*) is activated at 48 h and the phagocytic number remained high at the 72nd h of infection. During the early stage of the infection process (between the 2^{-nd} and 24^{-th} h) the absolute segmented neutrophil count, the absolute band count, band-neutrophyl ratio, tend to have high sensitivity, whereas an abnormal leukocyte count is registered at 48 h.*

Fibrinogen increase is registered the earliest (at 24^{-th} h). Its concentrations remain high till the end of the study. The changes in the blood protein profiles show that the α_2 -globulin fraction rises at the 48^{-th} and 72^{-nd} h. Albumin was significantly lower at 72 h compared to the baseline values. There are no statistically significant changes in the total protein, A/G ratio and sialic acid, which we determined.

*The obtained data about the red blood cell parameters shows that *Staphylococcus aureus* induces a moderate anaemia when applied in dogs. Deviations are also registered in the mean corpuscular hemoglobin, while the other red blood cell indices – mean corpuscular hemoglobin concentration and mean corpuscular volume, are within normal reference ranges.*

We conclude that it is always better to combine immunological, hematological and biochemical indices. The key is to choose tests that

* Rad primljen za štampu 27. 08. 2010. godine

** Assoc. Prof. Maria Andonova , Department of General and Clinical Pathology; Assoc. Prof. Dimitritchka Dimitrova, Department of Pharmacology; Professor Ivan Borissov, Department of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

are frequently used and to ensure more rapid information about the infectious process.

Key words: *nonspecific defense mechanisms, dogs, infection, Staphylococcus aureus*

Introduction / Uvod

The frequency of Gram-positive infections in dogs and cats has increased during the last two decades (Dow et al., 1989; Martin et al., 2003). The diseases that *Staphylococcus aureus* causes, vary from small furuncles to sepsis (Scott, 2001). This facultative bacteria can provoke the host defence by different mechanisms. It has been shown to release exotoxins that act as superantigens (Alouf and Muller-Alouf, 2003). The key elements of bacteria are peptidoglycan (PGN), lipoteichoic acid (LTA) (De Kimpe et al., 1995; Ruhland and Fiedler, 1990). The wide spectrum of structural and secretory components, by which the staphylococci comes into complex relationships with the macroorganism (Allaker et al., 1991; Jarraud et al., 2001; Moulding et al., 1999), their high variability and the rapidly developing antibiotic resistance (Bergoge-Berezin, 2000; Toshkova, 1994; Urumova, 2004) are only part of the reasons troubling the struggle against these agents.

Monshouwer (1996) indicates, that acute-phase response of the organism can exert a significant influence over the absorption, distribution, metabolism and the excretion of the drugs applied at this early stage of infection, as well as increase or diminish their therapeutic effect. The acute-phase reactants are a separate group of proteins that increase in serum rapidly (within 12-48 h) (Bau-mann and Gauldie, 1994; Gabay and Kushner, 1990; Petersen et al., 2004). Raised serum levels are the result of increased hepatic synthesis mediated by cytokines – mainly tumor necrosis factor - α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), IL-6 (Medzhitov and Janeway, 2000; Pannen and Robotham, 1995; Van Miert, 1991; Van Miert, 1995).

As a result of the total changes in blood protein profiles, associated with the infection, the plasma viscosity and erythrocyte sedimentation rate (ESR) increase (Gruys et al., 1994; Suffredini, 1999). TNF- α , IL- are released by the activated cell elements in the blood and tissues, the most important of which are the professional phagocytes – polymorphonuclear neutrophilic, eosinophilic granulocytes (microphages) and mononuclear phagocytes (macrophages) (Celada and Nathan, 1994; Krause, 2000). The total microphage cell count is approximately 2.5×10^{12} . Only 5% of these cells are located in the blood (Kayser et al., 2005). Through the blood, however, is realized the transportation and recirculation of the cell elements and their products. It contains the humoral factors of innate immunity – lysozyme, complement (alternative activation pathway), serum proteins (Leitch and Willcox, 1990). Due to this, the analysis of the cell and humoral can

give valuable data for the status of the mobilization of the early mechanisms of defence (Paape et al., 1985; Pagana and Pagana, 1988) that ensure the control of the infection until the induction of adaptive immunity. The use of multiple markers, in particular, combining early sensitive markers with late specific tests will further enhance the diagnostic accuracy in identifying infected cases (Philip and Hewitt, 1980; Rodwell et al., 1993) and may be used for early termination of antibiotic treatment. It is expedient when choosing a given drug for the treatment of a staphylococcal infection to have in mind the occurring changes in the non specific defense mechanisms during the early stage of infection.

The present study had the objectives to examine in dynamics (till the seventy second hour) the neutrophil phagocytosis (by fluorescein isothiocyanate – FITC labeled *Staphylococcus aureus*), hematological indices, electrophoretic profiles associated with the experimental staphylococcal infection in dogs.

Material and methods / Materijal i metode rada

Experimental animals / Eksperimentalne životinje

The animals used were 9 clinically healthy mixed-breed male dogs at the age of 2-5 years, weighing $14,3 \pm 1,8$ kg b.w. The animals were bred at a controlled temperature of 21°C , 60 % humidity, and a 12/12 light regimen in the Hospital for Small Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University. Twice daily, the animals were allowed a 30 minute walk. The dogs were fed twice a day with a granulated food ("Jambo dog", Gallisman S.A., Bulgaria), and the water supply was *ad libitum*.

Thirty days prior to their inclusion in the experiment the dogs were dewormed with the combination of praziquantel and abamectin (Prazimec-D, Biovet JSC, Peshtera, Bulgaria) at a dose of 1 tablet for 10 kg b.w. Ectoparasites were treated with a combination of permethrin and carbaril (Tapilan-B, Dorvet, Israel).

Experimental design / Plan eksperimenta

The experimental infection was provoked by a subcutaneous injection (s. c.) in the right hind limb of 5 mL, 24-hour broth culture of *Staphylococcus aureus* – field strain, with a concentration of 1×10^8 CFU/mL. The identification of the strain was made with a semi-automatic system for identification BD BBL Crystal Gram Positive ID System (Becton Dickinson Diagnostic).

The strain is catalase positive, oxidase negative, plasmocoagulase and desoxyribonuclease producing.

The following was registered for every dog: behavior, appetite, color of conjunctivas, skin integrity, presence of effusions. The possible presence of edema, warmness and painfulness were registered visually and by palpation.

Collection of blood / Sakupljanje krvi

Blood samples were collected immediately prior to the experimental infection with *Staphylococcus aureus* (baseline = 0 h) and at 2, 4, 24, 48 and 72 h after infection, from v. cephalica anterior, between 7.30-8.00 am for the elimination of circadian influence. Blood was collected into vacutainers.

A heparinized (20 IU) sample (1 mL) was used in the phagocytosis assay. It was stored in ice and used within an hour from collection time.

To obtain serum, the blood samples were kept at room temperature at 1h to allow to clot. They were then centrifuged (1000 x g, 10 min, 20°C).

Red blood cell parameters / Parametri crvenih krvnih zrnaca

Red Blood Cells (RBC) were determined in a Bürker chamber [(Transmedimpex), Vienna, Austria]. Hemoglobin (Hb) content was determined with the use of an acid-base analyser [(ABL-3, Radiometer), Denmark]. Packed cell volume (PCV) was determined by the microhaematocrit method. The following red blood cell indices were registered: mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular volume (MCV). The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by the micro-method of Panchenko (mm/h).

Cellular factors and mechanisms of innate immunity /

Čelijski faktori i mehanizmi prirodnog imuniteta

White Blood Cell (WBC) count was determined in a Bürker chamber [(Transmedimpex), Vienna, Austria]. Differential white blood cell counts were performed on blood smears stained with May-Grünwald and Giemsa solutions by counting 200 leukocytes. As indicators of early infection the following haematological indices were applied: absolute neutrophil count (ANC); absolute band count (ABC); band neutrophil ratio (BNR – was defined as the fraction of immature to total neutrophil forms); immature to mature neutrophil ratio (I/M) were determined. All bands and cell forms less mature than bands were classified together as immature neutrophils. Segmented (mature) neutrophils were defined as having a filamentous bridge between nuclear lobes.

Neutrophil phagocytosis was determined in peripheral blood (Samnaliiev et al., 1995) via fluorescein-isothiocyanate (FITC, Sigma, St. Louis, MO) conjugated staphylococci (strain 209) (1×10^7 CFU/mL), fresh autologous serum.

Fluorescent labeling of bacteria / Fluorescentno obeležavanje bakterija

The culture of *Staphylococcus aureus* (strain 209) was washed once in saline, resuspended in PBS and adjusted to a final concentration of 10^9 CFU/ mL. A volume of 1 mL of the bacterial suspension in 0.1 M Na_2CO_3 buffer - pH 9.6 and 0.06 % FITC solution were mixed by rotation (100 r.p.m.) for 60 min at room temperature, protected from light. After staining, FITC-labeled bacteria were washed twice in PBS and the concentration of live bacteria was adjusted to 3×10^7 /mL.

In the phagocytosis assays the neutrophils were stained with ethidium bromide (EB-Sigma – 0.5 µg/mL working solution). Quenching solution was used to extinguish any extracellular fluorescence. The phagocytic neutrophils were expressed from 100 neutrophils as the proportion of cell able to phagocytize more than three bacteria. The phagocytic number was calculated as the ratio of the number of phagocytized staphylococci and the number of phagocytizing cells.

Humoral factors of innate defence – proteins /

Humoralni faktori prirodne odbrane – proteini

Fibrinogen was determined with a commercial kit (HemoStat Fibrinogen Test Set, Human GmbH, Germany). Biuret's reaction was used for the total protein. Gel electrophoreses was done using a standard method for the determination of albumin, alpha-1 globulin (α_1), alpha-2 globulin (α_2), beta-globulin (β) and gamma (γ) globulin. Protein fractions were registered by densitometer.

The level of serum sialic acid was determined by spectrophotometry (Sydow, 1985).

Statistical analysis / Statistička analiza

The obtained data was processed statistically with a computer program (StatMost, v. 2.5, DataMost Co., USA). The t-test by Student was used, the ANOVA-test was also applied, followed by a post-hoc Tukey's HSD test. The data were presented as mean \pm SD. Differences were considered statistically significant at the $p<0.05$ level.

Results / Rezultati

The experimental *Staphylococcus aureus* infection causes changes in one of the early non-specific defense mechanisms – phagocytosis. The neutrophil phagocytic indices (% neutrophil phagocytosis, phagocytic number) at the 48th h from the application of the pathogen reach their maximal values – respectively: $30.33 \pm 5.02\%$ and 2.70 ± 1.01 compared to the initial ones – $26.22 \pm 3.11\%$ and 1.70 ± 0.49 (Figure 2). The registered raise of the phagocyte number during this period is statistically significant compared to the initial value ($p<0.001$), and compared to the value at the 24th h, when it is 1.93 ± 0.31 . This parameter at the 72nd h of the staphylococcal infection remains at its high level – 2.26 ± 0.36 .

The used haematological indices for the evaluation of the changes in the white blood cells of the dogs with experimental staphylococcal infection are shown in Table 1. The WBC is one of the fast reacting and widely used laboratory parameters. Its values decreased as early as the 2nd hour after the staphylococcal infection to $6.63 \pm 1.44 \cdot 10^9/L$ vs. $9.14 \pm 2.10 \cdot 10^9/L$. Although it is statistically significant ($p<0.05$) this decrease is within the standard for this biological species. Leukocytes subsequently increased up to $15.42 \pm 2.73 \cdot 10^9/L$ by hour 48 ($p<0.001$) of the experimental infection. The value remained high at the 72nd h as

well. The changes in the absolute neutrophil count (ANC) are similar to those in WBC. The registered decrease at the second hour is not statistically significant. It is followed by a rapid increase in the values of the index, which at the 48th h reaches its maximum $10.0 \pm 2.38 \cdot 10^9/L$ ($P < 0.001$) vs. at baseline $5.33 \pm 1.26 \cdot 10^9/L$, vs. 2 h - $4.26 \pm 1.38 \cdot 10^9/L$ ($p < 0.001$). Neutrophil activation is reflected in the peripheral blood in a rise of the absolute neutrophil count and left shift of neutrophils (increased immature – band to total neutrophil ratio). The statistically significant changes in ABC and the absolute count of the segmented neutrophils occurs already at the 2-4th h from the infection (Table 1), whereas I/M reaches high levels in the period between the 4th and – 48th h.

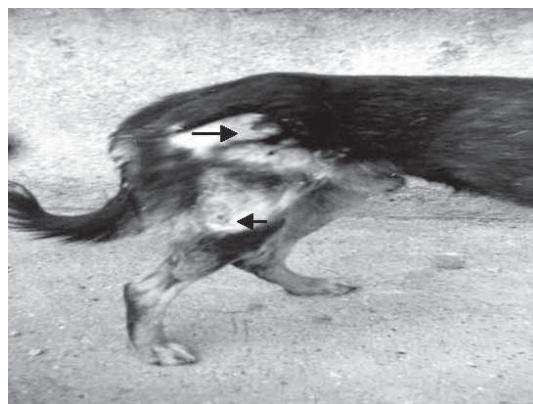


Figure 1. Dog with erosions on tissues and hair loss in region of inoculation

of broth culture of *Staphylococcus aureus* /

Slika 1. Pas sa erozijama na tkivu i gubitkom dlake u predelu mesta inokulacije
bujon kulturom *Staphylococcus aureus*

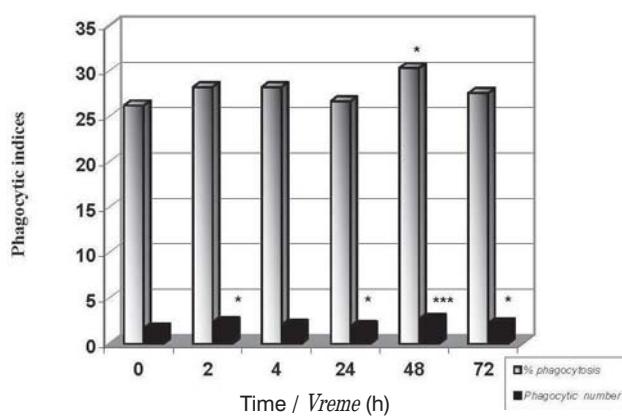


Figure 2. Phagocytic indices in dogs with experimental infection induced by *Staphylococcus aureus* /

Slika 2. Indeksi fagocita kod pasa sa eksperimentalnom infekcijom izazvanom bakterijom *Staphylococcus aureus*

Table 1. Haematological tests in dogs with experimental infection induced by *Staphylococcus aureus* - field strain (1×10^8 CFU/mL), (mean \pm SD) /
 Tabela 1. Hematološki testovi na psima sa eksperimentalnom infekcijom izazvanom terenskim sojem
Staphylococcus aureus (1×10^8 CFU/mL) (srednja \pm SD)

| Dynamics (hour) / Tempo (sati) | n | WBC (10^9 /L) | Haematological indices / Hematološki indeksi | | | | |
|--|--------------|--|--|---|-----------|----------------------------------|------|
| | | | ANC (10^9 /L) | ABC (10^9 /L) | BNR | Neu – segment (10^9 /L) | I/M |
| 0 | 9 | 9.14 (2.10) | 5.33 (1.26) | 0.31 (0.25) | 0.05 | 2.90 (0.73) | 0.10 |
| 2 | 9 | 6.63 (1.44) a | 4.26 (1.38) | 0.30 (0.17) | 0.07 | 1.94 (0.54) a ₁ | 0.15 |
| 4 | 9 | 8.83 (2.55) b ₁ | 7.12 (2.36) b ₁ | 1.20 (0.79) a,b | 0.17 | 1.26 (0.68) a ₂ ,b | 0.95 |
| 24 | 9 | 11.60 (2.96) a ₁ ,b ₂ ,c | 9.36 (2.90) a ₁ ,b ₂ ,c | 1.50 (0.64) a ₁ | 0.16 | 1.85 (0.45) a ₁ ,b | 0.81 |
| 48 | 9 | 15.42 (2.73) a ₂ ,b ₂ ,c ₂ ,d ₁ | 10.0 (2.38) a ₂ ,b ₂ ,c | 1.88 (0.97) a ₂ ,b ₂ | 0.19 | 2.53 (0.89) c ₁ | 0.74 |
| 72 | 9 | 11.77 (2.21) a b ₂ ,c,e | 8.05 (2.14) a ₁ ,b ₂ ,c | 1.21 (0.69) a ₁ ,b ₁ | 0.15 | 2.52 (0.83) c ₁ | 0.48 |
| Reference ranges / Referentni rasponi | #; * 6-17 | 3.5-12 | #; * 0-0.30 | #; * 3-11.5 | 0.12-0.30 | | |

WBC – white blood cell count; ANC – absolute neutrophil count; ABC – absolute band count; BNR – band-neutrophil ratio; Neu-segment – mature neutrophil; I/M – immature to mature (segment) neutrophil ratio / WBC – bela krvna zrnca; ANC – apsolutni broj neutrofila; ABC – apsolutni broj raspona; BNR – odnos raspon-neutrofil; Neu-segment – zreli neutrofil; I/M – odnos nezreli do zreli (segment) neutrofila

– Comazzi, S. et al., 2004; * – Jain, M.C., 1986

a ($p<0.05$); a₁ ($p<0.01$); a₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 0 h; b ($p<0.05$); b₁ ($p<0.01$); b₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 2 h; c ($p<0.05$); c₁ ($p<0.01$); c₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 4 h; d ($p<0.05$); d₁ ($p<0.01$); d₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 24 h; e ($p<0.05$); e₁ ($p<0.01$); e₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 48 h; f ($p<0.05$); f₁ ($p<0.01$); f₂ ($p<0.001$) Significantly different from values at 72 h /
 a ($p<0.05$); a₁ ($p<0.01$); a₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 0h; b ($p<0.05$); b₁ ($p<0.01$); b₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 2h; c ($p<0.05$); c₁ ($p<0.01$); c₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 4h; d ($p<0.05$); d₁ ($p<0.01$); d₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 24h; e ($p<0.05$); e₁ ($p<0.01$); e₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 48h; f ($p<0.05$); f₁ ($p<0.01$); f₂ ($p<0.001$) Značajno različite od vrednosti kod 72h

In Table 2 are presented the changes registered till the 72nd h in hemoglobin, packed cell volume, erythrocytes and ed blood cell indices, in dogs with experimental staphylococcal infection. Hemoglobin and erythrocytes during the whole monitored period vary in the characteristic for this biological species,

bordering on the reference (statistical norm) (120-180 g/L for Hb and 5.5-8.5 $10^{12}/L$ for RBC). The PCV, however, at the seventy second hour is $0.28 \pm 0.05 L/L$, which is statistically significantly lower than the baseline value $0.33 \pm 0.02 L/L$ ($p < 0.05$); also from the value at the second hour – $0.35 \pm 0.07 L/L$ ($p < 0.01$) and from that typical for the dog species variations of this parameter (Comazzi et al., 2004; Jajin, 1986). From the red blood cell indices only MCH at the 72nd h from the development of the experimental infection shows 31.3 ± 8.67 pg, which is statistically significantly higher than the baseline – 23.4 ± 4.99 pg ($p < 0.05$). The ESR tended to be enhanced at the 48th and the 72nd h from the experimental infection when it runs up to 13 and 15 mm/h compared to 4 ± 2.2 mm/h at the baseline ($p < 0.05$).

Table 2. Hemoglobin, packed cell volume, red blood cell and red blood cell indices in dogs with experimental infection induced by *Staphylococcus aureus* - field strain ($1 \times 10^8 CFU/mL$) (mean \pm SD)

Tabela 2. Hemoglobin, upakovan volumen ćelija, eritrociti i indeksi crvenih krvnih zrnaca kod pasa sa eksperimentalnom infekcijom izazvanom terenskim sojem *Staphylococcus aureus* ($1 \times 10^8 CFU/mL$) (srednja \pm SD)

| Dynamics (hour) / Tempo (sati) | Hb (G/L) | PCV (L/L) | RBC ($10^{12}/L$) | Redblood cell indices / Indeksi crvenih krvnih zrnaca | | | |
|--|----------------|---------------------------------------|------------------------|--|----------------|--------------|-------------------|
| | | | | MCH (pg) | MCHC (g/dL) | MCV (fl) | ESR mm/h |
| 0 | 132 (23) | 0.33 (0.02) | 5.73 (0.38) | 23.4 (4.99) | 40 (8.2) | 58 (4.7) | 4 (2.2) |
| 2 | 134 (18) | 0.35 (0.07) | 5.63 (0.55) | 27.6 (5.30) | 39 (8.4) | 67 (12.9) | 7 (6.6) |
| 4 | 132 (24) | 0.30 (0.04) b | 5.69 (0.56) | 26.2 (7.12) | 44 (6.7) | 60 (7.6) | 6 (5.4) |
| 24 | 133 (26) | 0.32 (0.01) | 5.90 (0.19) | 25.1 (4.97) | 42 (7.9) | 60 (6.1) | 8 (6.6) |
| 48 | 126 (18) | 0.29 (0.05) b ₁ | 5.60 (0.50) | 22.7 (3.40) b | 42 (12.5) | 57 (15.4) | 13 (11.3) a |
| 72 | 122 (15) | 0.28 (0.05) a,b ₂ ,d | 5.61 (0.80) | 31.3 (8.67) a,e | 46 (9.6) | 70 (20.9) | 15 (15) a |
| Reference ranges / Referentni rasponi | #;* 120-180 | #;* 0.37-0.55 | #;* 5.5-8.5 | *;* 19.5-24.5 | *;* 32-36 | *;* 60-77 | 0-5 |

Hb – hemoglobin; PCV – packed cell volume; RBC – red blood cell; MCH – mean corpuscular hemoglobin; MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV – mean corpuscular volume; ESR – erythrocyte sedimentation rate /

Hb – hemoglobin; PCV – hematokrit, odnosno volumen ćelija pune krvi; RBC – crvena krvna zrna; MCH – srednji korpuskularni hemoglobin; MCHC – srednja koncentracija korpuskularnog hemoglobina; MCV – srednji volumen korpuskula; ESR – stepen sedimentacije eritrocita

– Comazzi, S. et al., 2004; * – Jain, M.C., 1986; • – Pannen, B. & J. Robothan, 1995

a ($p<0.05$); $a_1(p<0.01)$; a_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 0 h; b ($p<0.05$); b_1 ($p<0.01$); b_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 2 h; c ($p<0.05$); c_1 ($p<0.01$); c_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 4 h; d ($p<0.05$); d_1 ($p<0.01$); d_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 24h; e ($p<0.05$); e_1 ($p<0.01$); e_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 48h; f ($p<0.05$); f_1 ($p<0.01$); f_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 72 h /

Table 3. Values of biochemical profile in dogs with experimental infection produced by *Staphylococcus aureus* - field strain (1×10^8 CFU/mL) (mean \pm SD) /

Tabela 3. Vrednosti biohemijiskog profila u pasa sa eksperimentalnom infekcijom izazvanom terenskim sojem *Staphylococcus aureus* (1×10^8 CFU/mL) (srednja \pm SD)

| Parameters | 0 h | 2 h | 4 h | 24 h | 48 h | 72 h | Reference ranges / Referentni rasponi |
|--|----------------|-----------------|----------------|--|--|--|---------------------------------------|
| Total protein/ Ukupni protein (g/L) | 67.0 (9.29) | 64.8 (13.75) | 56.9 (12.5) | 56.8 (7.93) | 66.7 (12.60) | 62.8 (15.32) | # 56-76 |
| Albumin / Albumin (g/L) | 19.8 (7.02) | 18.8 (4.98) | 15.8 (4.38) | 17.8 (3.29) | 14.9 (6.23) | 14.6 (4.85) à | # 26-39 |
| α_1 globulins / α_1 globulini (g/L) | 6.3 (2.72) | 5.4 (2.54) | 6.0 (1.86) | 6.6 (1.64) | 6.5 (2.16) | 6.0 (1.55) | # 2-11 |
| α_2 globulins / α_2 globulini (g/L) | 9.2 (1.89) | 9.1 (2.30) | 7.5 (2.08) | 8.4 (2.08) | 11.1 (2.72) c _{1,d} | 11.2 (4.32) c _{1,d} | # 4-9 |
| β globulins / β globulini (g/L) | 16.6 (4.12) | 16.0 (6.10) | 14.6 (6.00) | 13.7 (5.84) | 17.0 (4.50) | 13.9 (3.81) | # 9-19 |
| γ globulins / γ globulini (g/L) | 15.2 (6.99) | 15.3 (7.10) | 12.8 (5.36) | 12.8 (4.60) | 17.0 (4.46) | 17.0 (6.70) | # 15-30 |
| Fibrinogen / Fibrinogen (g/L) | 2.48 (0.66) | 2.62 (0.60) | 2.42 (0.59) | 3.89 (0.56) a _{2,b_{2,c₂}} | 3.81 (1.11) a _{2,b_{2,c₂}} | 3.79 (0.76) a _{2,b,c₂} | # 1.0-3.0 |
| Sialic acid / Sialična kiselina (mmol/L) | 2.41 (0.10) | 2.46 (0.60) | 2.11 (1.11) | 2.13 (0.23) | 2.23 (0.58) | 2.65 (0.66) | # 1.9-2.5 |
| A/G ratio / Odnos A/G | 0.42 | 0.41 | 0.38 | 0.43 | 0.29 | 0.30 | # 0.53-1.10 |

A/G – albumin/globulin ratio / A/G – odnos albumin/globulin; #– Kristensen F. & Barsanti J., 1977;
a ($p<0.05$); $a_1(p<0.01)$; a_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 0 h; b($p<0.05$); b_1 ($p<0.01$); b_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 2 h; c ($p<0.05$); c_1 ($p<0.01$); c_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 4 h; d ($p<0.05$); d_1 ($p<0.01$); d_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 24 h; e ($p<0.05$); e_1 ($p<0.01$); e_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 48 h; f ($p<0.05$); f_1 ($p<0.01$); f_2 ($p<0.001$) Significantly different from values at 72 h.

The possible role of some acute phase proteins (APPs) in pathogenesis and diagnosis of staphylococcal infection has been investigated. The electro-phoretic profiles, concentration of fibrinogen, sialic acid and A/G ratio associated with the experimental infection are presented in Table 3. In our experimental

model, fibrinogen is the parameter for which is registered the earliest (at the 24th h) statistically significant rise ($p<0.001$). The fibrinogen concentration remains high till the end of the study. It is followed by a statistically significant rise of the α_2 -globulins at the 48th and the 72nd h (Table 3). At the 72nd h from the application of *Staphylococcus aureus*, the dogs show a fall in albumin ($p<0.05$) compared to the baseline values. There are no statistically significant changes in the sialic acid and the A/G ratio, which we determined.

The experimental staphylococcal infection in dogs is accompanied by painlessness, edematisation and high temperature of the tissues at the site of injection, together with disturbed motor activity followed by an increase of the inguinal lymphatic nodes of the injected limb at the 24th h. Subsequently, hair loss was observed in the region of inoculation of the broth culture, in an area with a diameter of 10-20 cm, and the appearance of crater-like erosions of the tissues 3-5 cm in diameter (Figure 1). The motor activity of the animals was disturbed. Increased thirst and a lack of appetite were also observed.

Discussion / Diskusija

Staphylococcus aureus is a part of the resident microflora of the skin in the dog, but in some cases it multiplies rapidly, colonizes large areas of the epidermis and shows pathogen properties (Scott, 2001). The staphylococcal pyoderma is the most commonly diagnosed skin disease for this biological species. Almost 80 % of dogs with allergic and skin symptoms develop a secondary bacterial infection.

The afore mentioned facts motivated us to apply this experimental model, involved with a reproduction of bacterial infection in dogs by a subcutaneous application of *Staphylococcus aureus*. Its possesses a wide spectrum of structural and secretory components, by which it provokes the defense mechanisms of the organism (Onogawa, 2000; Somerville et al., 2003). The phagocytes, which provide the first defence line, when activated release pro-inflammatory mediators (Heumann et al., 1994; Mattsson et al., 1993; Standiford et al., 1994). The large amount of neutrophils and their high phagocytic activity determines them as a dominant factor for elimination of the pathogens that penetrate into the organism (Edwards, 1994). Shearer and Day (Shearer and Day, 1997) prove that the staphylococcal antigen alone, or in a complex with antibodies, is capable of stimulating an oxidative burst in the neutrophils. Based on these *in vitro* observations, we tested the *in vivo* neutrophil phagocytosis in dogs with experimental staphylococcal infection. The high values of the phagocytic number at the 48th h ($p<0.001$) can be treated as proof that when applied on dogs *Staphylococcus aureus* intensifies the process of internalization (engulfing) of bacteria from the activated phagocytes. Besides this, the use of peripheral blood and fresh autologous serum in the fluorescent assay by which we prove the neutrophil phagocytosis, al-

lows us to give an account of the effects over this process by the other cell and humoral elements. It is known that phagocytosis is a complicated nonspecific defence mechanism the effectiveness of which depends on the influence of a number of factors – complement, lysozyme (Leitch and Willcox, 1999), immunoglobulins (Mazza et al., 1993) adhesion molecules (Serrander et al., 1999; Verdrengh et al., 2000), metabolism (Lefkowitz et al., 2000; Sartorelli et al., 1999) hormonal profile (DeBowes and Anderson, 1991; Van der Goes et al., 2000).

Our studies show that the changes in the phagocytic indices are preceded by changes that occur in other important humoral factors – the serum proteins. The fibrinogen concentration even at the 24th h reaches a level that is significantly higher compared not only to the baseline ($p<0.001$), but also to the one at the second h ($p<0.001$) and the forth h. The values of the fibrinogen remain high till the end of the study – the 72nd h. Therefore this parameter can be considered as a sensitive indicator for a developing infection. The fibrinogen is “positive” acute phase proteins (APPs) and is closely connected to the neutrophil activation, migration and adhesion. These effects are a direct consequence of its possibility to connect specifically with α -subunits of CD11b/CD18 over the surface of the neutrophils (Herrick et al, 1999; Kuhns et al., 2001; Smiley et al., 2001). It is interesting that in the present study the peak concentration of fibrinogen was attained around the registered rise of the α_2 -globulins at the 48th h and the 72nd h (Table 3). This electrophoretic change is a result of a rise in the levels of APPs, because many of them migrate to the α_1 - and α_2 -globulin zone. The structure of the latter includes a number of acute phase proteins – ceruloplasmin, heptaglobulin α_2 -macroglobulin, and some components of the complement system – C3, C4. The increased synthesis of “positive” APPs is associated with diminished synthesis of “negative” APPs, such as albumin (Table 3). At the 72nd h from the application of *Staphylococcus aureus*, the dogs showed a lowering of this parameter, compared to the baseline values ($p<0.05$). The liver acute phase reactant proteins together with (γ) globulin fraction, including various immunoglobulin classes are best visualised by electrophoresis.

APPs and phagocytosis assays are nonspecific, but they are actually more stable and are strong homeostatic regulatory mechanisms. They can be more closely related to disease progression or recovery.

In experimental dogs, the raised ESR (48 h, 72 h – Table 2) indicate a presence of infection. It could be interpreted with regard to the changes in fibrinogen, which is a humoral factor influencing a function of groups of the sialic acid in the cell membrane of the erythrocytes.

During the early stage (<72 h) of the development of staphylococcal infection WBC is the more sensitively changing hematological parameter compared to RBC. From the used_indices the absolute segmented neutrophil count shows a decrease at the 2nd h ($p<0.01$) (Table 1), followed by changes in ABC – registered at the 4th h, and by similar ones in WBC and ANC, but registered in the period between the 24th and the 72nd h. The total neutrophil count and ratio of

band to total neutrophil is useful in more than 80 % of the cases in the diagnosis (Kalayci et al., 2000; Kupperman et al., 1999). In general, the absolute segmented neutrophil count, and ABC, tends to have high sensitivity, whereas abnormal leukocyte count – the leukocytosis is at the 48th h. The ratio of band to total neutrophil has been shown to be a good hematological marker in the early diagnosis of neonatal sepsis (Manroe et al., 1979; Rodwell et al., 1993).

The determination of PCV is a fast and comparatively precise and accessible method, which applied in our experimental model, shows a lowering at the seventy second hour from the injection of *Staphylococcus aureus*, that runs without changes in the erythrocyte and hemoglobin (Table 2). The decrease of the inspected parameter below the values of the referent interval is an indication for the presence of anemia. Proof of this were the changes in another red blood cell index – MCH. However, further testing is needed to confirm a diagnosis. This is so because there is a change only in MCH, and not in MCHC. Pagana and Pagana (1988) state a reference for these red blood cell indices in dogs – MCV = 60-77 fl; MCHC=31-37g/dL; MCH=26-34 pg. The mechanism(s), that provoked the development of anaemia during a staphylococcal infection needs more investigation. The origin of the latter could be from one side a result of direct influence over the erythropoiesis from a wide spectrum of proteins which the bacterial cell wall of *Staphylococcus aureus* possesses or the bacterial cell itself synthesizes (Bohash et al., 1990; De Kimpe et al., 1995; Jarraud et al., 2001). On the other hand, this could be due to an indirect effect achieved from the biologically active agents – cytokines released from the activated cell elements (Cleveland et al., 1996; Danforth et al., 1995), or from acute phase proteins synthesized under their influence such as hepsidin (Nancy, 2004; Thomas, 2006). The hematology results of Comazzi et al. (2004) indicate that anaemia is moderately frequent in dogs. These results confirm a higher sensitivity of PCV than hemoglobin in detecting anaemia. The different percentages of anaemic dogs identified using PCV rather than hemoglobin has already been reported (Tvedten, 1994).

In our experiment the changes could be considered as milder compared to those of the same parameters in severe sepsis and with connection to the developing multiple organ dysfunction syndrome (Aird, 2003; Chapazov, 2006).

Conclusion / Zaključak

The results of this study indicated that *Staphylococcus aureus* applied subcutaneously to dogs strengthens the process of neutrophil phagocytosis. During the early stage (second – twenty fourth hour) of the development of staphylococcal infection WBC is the more sensitively changing hematological parameter compared to RBC. In general, the absolute segmented neutrophil count, ABC, tend to have high sensitivity, contrary to abnormal leukocyte counts.

The red blood cell indices (MCV; MCHC; MCH) and PCV are the more sensitively changing indicators for a staphylococcal infection compared to the

erythrocyte and the hemoglobin. "Blood tests" should never be viewed as a substitute for a thorough clinical examination and case history-gathering; the results should be carefully assessed in the light of the patient status and taking into account all other information. In general, it is always better to combine immunological, hematological and biochemical indices. The key is to choose tests that are frequently needed and to ensure more rapid information on the infectious process.

References / Literatura

1. Aird W. The hemathologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. Mayo Clin Proc 2003; 78: 869-81.
2. Allaker RP, Lampert AI, Lloyd DH. Production of "virulence factors" by *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of canine pyoderma and healthy carriers. Microb Ecology Health Dis 1991; 4: 169-73.
3. Alouf J, Muller-Alouf H. Staphylococcal and streptococcal superantigens. Molecular biological and clinical aspects. Int J Med Microbiol 2003; 292: 429-40.
4. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today 1994; 15: 74-80.
5. Bergog E-Berezin E. Resistance and new antibiotic strategies. The problem with staphylococcus. Presse Med 29, 2018-21, 2000.
6. Bohash G, Fast D, Nelson R, Schlievert P. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol 1990; 17(4): 251-72.
7. Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. Immunol Today 1994; 15(3): 100-2.
8. Chaprazov Ts. Changes in some clinical and laboratory indices in dogs with experimental *Staphylococcus aureus* sepsis. BJVM 2006; 9(1): 51-60.
9. Cleveland M, Gorham J, Murphy T, Tuomanen E, Murphy K. Lipoteicholic acid preparations of Gram-positive bacteria induce interleukin 12 through a CD14 dependent pathway. Infect Immun 1996; 64: 1906-12.
10. Comazzi S, Pieralisi C, Bertazzolo W. Haematological and biochemical abnormalities in canine blood. Frequency and associations in 1022 samples. J Small Anim Pract 2004; 45: 343-9.
11. Danforth J, Strieter R, Kunkel S, Arenberg D, Van Otteren G, Standiford T. Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteicholic acid. Clin Immunol Immunopathol 1995; 74: 77-83.
12. De Kimpe S, Kengatharan M, Thiemann C, Vane J. The cell wall components peptidoglycan and lipoteicholic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 10359-63.
13. DeBowes LJ, Anderson NV. Phagocytosis and erythrocyte antibody-rossette formation by three populations of mononuclear phagocytes obtained from dogs treated with glucocorticoids. Am J Vet Res, 1991; 52(6): 869-72.
14. Dow S, Curtis C, Jones R, Wingfield WE. Bacterial culture of blood from critically ill dogs and cats. J Am Vet Med Assoc 1989; 195: 113-5.
15. Edwards SW. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge, UK, Cambridge University Press, pp 1-319, 1994.

16. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340, 448-54.
17. Gruijs E, Obwolo MJ, Toussaint M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull* 1994; 64(11) 1009-18.
18. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell B* 1999; 31: 741-6.
19. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 1994; 62, 2715-21.
20. Jain MC. The dog: normal hematology with comments on response to disease. In: *Veterinary Hematology*, 4th edn, Jain M.C. (ed), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 103-25, 1986.
21. Jarraud S, Peyrat M, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens of *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2001; 166: 669-77.
22. Kalayci AG, Yilmazer F, Adam B, Sancak R, Kucukoduk S. The importance of fibronectin, haptoglobin, ceruloplasmin and transferring in the early diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Med Sci* 2000; 30: 151-5.
23. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medical Microbiology*, Thieme, Stuttgart, New York, pp 21-30, 2005.
24. Krause KH. Professional phagocytes: predators and prey of microorganisms. *Schweiz Med Wochenschrift* 2000; 130(4): 97-100.
25. Kristensen F, Barsanti J. Analysis of serum proteins in clinically normal pet and colony cats, using agarose electrophoresis. *Am J Vet Res* 1977; 38: 399-402.
26. Kuhns D, Nelson E, Alford W, Gallin J. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with fMLP and LTB4. *J Immunol* 2001; 167: 2869-75.
27. Kuppermann N, Edward A, Walton MD. Immature Neutrophils in the Blood Smears of Young Febrile Children. *Arch Pediat Adol Med* 1999; 153: 261-6.
28. Lefkowitz DL, Stuart R, Gnade BT, Roberts E, Lefkowitz SS. Effects of a glyconutrient on macrophage functions. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(4): 299-308.
29. Leitch EC, Willcox MD. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol* 1999; 48(9): 867-71.
30. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979; 95: 89-8, 1979.
31. Martin GS, Mannino DM, Eaton S. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New Engl J Med* 2003; 348(16): 1546-54.
32. Mattsson E, Verhage L, Roloff J, Fleer A, Verhoef J, Van Dijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; 7: 281-7.
33. Mazza G, Duffus WPH, Elson CJ, Stokes CR, Wilson AD, Whiting A. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. *J Immunol Methods* 1993; 161: 193-203.
34. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *New Engl J Med* 2000; 343: 338-44.

35. Monshouwer M. Acute phase response mediated effects on hepatic drug metabolism in pigs: an in vivo and in vitro approach. PhD thesis, Utrecht University, pp 1-10, 1996.
36. Moulding DA, Walter IC, Hart CA, Edwards SW. Effects of Staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. Infect Immun 1999; 67(5): 2312-8.
37. Nancy CA. Anemia of inflammation: the cytokine-hepsidin link. J Clin Invest 2004; 113: 1251-53.
38. Onogawa T. Staphylococcal alpha toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 29: 15-21.
39. Paape M, Schultze W, Guidry N. Development of natural defence mechanisms. Kieler Milchw Forsch 1985; 37: 447-57.
40. Pagana KD, Pagana TJ. Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. St. Louis, Mosby, Inc., pp 108-14, 1988.
41. Pannen B, Robotham J. The acute phase response. J New Hollsteins 1995; 3: 183-97.
42. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet Res 2004; 35: 163-87.
43. Philip AG, Hewitt JR. Early diagnosis of neonatal sepsis. Pediatr 1980, 65: 1036-41.
44. Rodwell RL, Taylor K, Tudehope DI, Gray PH. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. Pediatr Infect Dis J 1993; 12: 372-6.
45. Ruhland G, Fiedler F. Occurrence and structure of lipoteicholic acids in the genus *Staphylococcus*. Arch Microbiol 1990; 154: 375-9.
46. Samnaliev M, Mladenov K, Draskova T, Samnalieva T, Padevsky P, Radinov A. Development and clinical assessment of some nonspecific factors of immunity. Proc First Nat Congr Immunol 1995; PV 31: 135-7.
47. Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F. Non-specific immunity and ketone bodies. I: *In vitro* studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. J Vet Med 1999; A 46: 613-9.
48. Scott DW. Small animal dermatology. Muller and Kirk's. 6th edn. Philadelphia, pp 950-84, 2001.
49. Serrander L, Larsson J, Lundqvist H, Lindmark M, Fallman M, Dahlgren C, Stendal O. Particles bindings beta (2)-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis. Biochim Biophys Acta 1999; 1452(2): 133-44.
50. Shearer DH, Day MJ. An investigation of phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus intermedius* by canine neutrophils *in vitro*. Vet Immunol Immunopathol 1997; 58, 219-30.
51. Smiley S, King J, Hancock W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol 2001; 167: 2887-92.
52. Somerville G, Cockayne A, Durr M, Peschel A, Otto M, Musser J. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. J Bacteriol 2003; 185; 6686-94.
53. Standiford T, Arenberg D, Danforth J, Kunkel S, VanOtteren G, Strieter R. Lipoteicholic acid induced secretion of interleukin 8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. Infect Immun 1994; 62: 119-25.
54. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP. New insights into the biology of the acute phase response. J Clin Immunol 1999; 19: 203-14.

55. Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. Biomed Biochim Acta 1985; 44: 11-2.
56. Thomas G. Hepsidin – a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 306: 183-98.
57. Toshkova KK. Methicillin resistant Staphylococci: mechanisms of resistance. Biomed Rev 1994; 3: 65-71.
58. Tvedten H. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques. In: Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 2nd edn. M. D. Willard, H. Tvedten, G. H. Turnwald (eds), W. B. Saunders, Philadelphia. pp 11-30, 1994.
59. Urumova V. Phenotype monitoring of resistance against antimicrobial drugs in bacterial isolates from farm animals and pets. PhD thesis, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, pp 205-12, 2004.
60. Van der Goes A, Hoekstra K, Van der Berg TK, Dijkstra CD. Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocyte/macrophages *in vitro*. J Leukocyte Biol 2000; 67(6): 801-7.
61. Van Miert A. Acute phase response and non-cellular defence mechanisms. Flemish Vet J 1991; 26: 69-91.
62. Van Miert A. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological and therapeutic aspects. Vet Quart 1995; 17: 41-50.
63. Verdrengh M, Erlandsson H, Harris H, Tarkowski A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus* induced arthritis. Eur J Immunol 2000; 30(6): 1606-13.

SRPSKI

NESPECIFIČNI ODBRAMBENI MEHANIZMI KOD PASA U TOKU EKSPERIMENTALNE INFEKCIJE STAFILOKOKAMA

Maria Andonova, Dimitritchka Dimitrova, I. Borissov

Cilj naših istraživanja bio je da izvršimo procenu nespecifičnih odbrambenih mehanizama (fagocitoza i odgovor u akutnoj fazi) kod pasa tokom eksperimentalne infekcije izazvane subkutanom aplikacijom *Staphylococcus aureus* (1×10^8 CFU/mL). Neutrofilna fagocitoza (evaluacija putem *Staphylococcus aureus* markiranim fluorescein izocijanatom) se aktivira kod 48h i broj fagocita je ostao visok kod 72h infekcije. U toku rane faze procesa infekcije (izmedju 2h i 24h) absolutni broj segmentiranih neutrofila, absolutni broj traka, odnos traka-neutrofil imaju tendenciju ka visokoj senzitivnosti, dok je abnormalni broj leukocita registrovan na 48h.

Porast fibrinogena je registrovan najranije (kod 24h). Njegova koncentracija ostaje visoka do samog kraja istraživanja. Promene u profilima krvnih proteina pokazuju da se frakcija α_2 -globulin povećava na 48h i 72h. Albumin je bio značajno niži na 72h u poređenju sa bazičnim vrednostima. Nismo ustanovili statistički značajne promene u ukupnim proteinima, odnosu A/G i sličnoj kiselini.

Dobijeni podaci o parametrima crvenih krvnih zrnaca pokazuju da *Staphylococcus aureus* primjenjen kod pasa izaziva umerenu anemiju. Kod srednjeg korpuskularnog hemoglobינה registrovane su devijacije, dok se drugi indeksi crvenih krvnih zrnaca –

srednja koncentracija korpuskularnog hemoglobina i srednji volumen korpuskula – nalaze unutar normalnih referentnih raspona.

Zaključili smo da je uvek bolje kombinovati imunološke, hematološke i biohemijske indekse. Ključno je odabrati testove koji se često koriste i obezbediti brže informacije o procesu infekcije.

Ključne reči: nespecifični odbrambeni mehanizmi, psi, infekcija, *Staphylococcus aureus*

РУССКИЙ

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОБОРОНИТЕЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ У СОБАК В ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ СТАФИЛОКОККАМИ

М. Андонова, Д. Димитрова, И. Борисов

Цель нашего исследования была, совершить нами оценку неспецифических оборонительных механизмов (фагоцитоз и ответ в острой фазе) у собак в течение экспериментальной инфекции субкутанной аппликацией *Staphylococcus aureus* (1×10^8 CFU/mL). Нейтрофильный фагоцитоз (путём *Staphylococcus aureus* маркированным флуоресцеин изоцианатом) активируется у 48 ч и число фагоцитов осталось высокое у 72 ч инфекции. В течение ранней фазы процесса инфекции (между 2ч и 24ч) абсолютное число сегментированных нейтрофилов, абсолютное число лент, отношение лента-нейтрофил имеют тенденцию к высокой сенситивности, пока ненормальное число лейкоцитов зарегистрировано на 48ч.

Рост фибриногенов зарегистрирован раньше всего (у 24 ч). Его концентрация остаётся высокая до самого конца исследования. Изменения в профилях кровяных протеинов показывают, что фракция α_2 -глобулина увеличивается на 48ч и 72ч. Альбумин был значительно ниже на 72ч в сравнении с базисными стоимостями. Нами не установлены статистически значительные изменения в совокупных протеинах, отношению А/Г и слюной кислоты.

Полученные данные о параметрах красных кровяных телец показывают, что *Staphylococcus aureus* применён у собак вызывает умеренную анемию. У среднего корпукуллярного гемоглобина зарегистрированы девиации, пока другие индексы красных кровяных телец - средняя концентрация корпукуллярного гемоглобина и срений объём корпукул - находятся внутри нормальных референтных расстояний.

Нами сделан вывод, что всегда лучше комбинировать иммунологические и биохимические индексы. Ключевое отобрать тесты, часто используемые и обеспечить более быстрые информации о процессе инфекции.

Ключевые слова: неспецифические оборонительные механизмы, собаки, инфекция *Staphylococcus aureus*

**PRIMENA RAZLIČITIH HISTOHEMIJSKIH METODA U
DIJAGNOSTICI ASPERGILoze MOZGA KOD ĆURIĆA***
**IMPLEMENTATION OF DIFFERENT HISTOCHEMICAL METHODS IN
DIAGNOSTICS OF BRAIN ASPERGILLOSIS IN TURKEY CHICKS**

B. Kureljušić, B. Savić, R. Prodanović, J. Đekić, V. Adamov,
Dobrila Jakić-Dimić, Biljana Miljković, O. Radanović, V. Ivetić**

Aspergiloza je često gljivično oboljenje različitih vrsta ptica i sisara, izazvano gljivicama roda *Aspergillus*. Karakteriše se inflamatornim promenama, pre svega, u respiratornom sistemu, mada ponekad protiče i u generalizovanoj formi kada je afektirano više organskih sistema. Kod ćuraka, pataka i gusaka opisan je mikotični granulomatozni meningoencefalitis sa pretežnom lokalizacijom u malom mozgu.

U radu je ispitano jato tovnih ćurića starosti 12 dana, kod kojih su se pojavile neurološke smetnje u vidu ataksije, tortikolisa, pareze i paralize zadnjih ekstermiteta i krila.

Kod tri od deset obdukovanih ćurića makroskopski nalaz je uka-zao na granulomatozni encefalitis malog mozga. Granulom bele boje, prečnika oko 3 mm, bio je situiran kranioventralno i jasno se uočavao na sagitalnom preseku malog mozga. Mikološkim ispitivanjem lezije iz malog mozga izolovana je gljivica *Aspergillus fumigatus*. Za procenu histopatoloških promena i dokaz hifa *Aspergillus fumigatusa* korišćene su hematoksilin-eozin (HE), Grocott i PAS metode. Mikroskopskim pre-gledom isečaka tkiva mozga bojenih HE metodom zapaženo je posto-janje granuloma sa centralno postavljenim nekrotičnim poljem. Polja nekroze su infiltrovana heterofilnim granulocitima i okolo okružena mak-rofagima, džinovskim ćelijama i limfocitima. Na periferiji granuloma se nalazi vezivno-tkivna kapsula. Hife gljivica, kao sastavni delovi granu-loma, bile su teško uočljive, a u nekim uzorcima bojenim HE metodom nisu se ni videle. Nasuprot ovome, u preparatima bojenim Grocott i

* Rad primljen za štampu 24. 12. 2010. godine

** Branislav Kureljušić, dr vet., istraživač pripravnik, dr Božidar Savić, istraživač saradnik, Radiša Prodanović, dr. vet., istraživač pripravnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; Jovo Đekić, dr vet.-spec; Vladica Adamov, dr vet.-spec, Veterinarski specijalistički institut „Zrenjanin“; dr sci. vet. med. Dobrila Jakić Dumić, viši naučni saradnik, mr sci. vet. med. Biljana Miljković, istraživač saradnik; mr Oliver Radanović, dr vet.-spec, dr sci. vet. med. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

PAS metodom jasno su se isticale septirane i razgranate hife u različitim delovima granuloma.

U cilju postavljanja etiološke dijagnoze mikotičnih oboljenja neophodno je pored izolacije primeniti i više histohemijskih metoda.

Ključne reči: čurići, histohemijske metode, meningoencefalitis, *Aspergillus fumigatus*

Uvod / Introduction

Aspergiloza je često gljivično oboljenje različitih vrsta ptica i sisara, izazvana gljivicama roda *Aspergillus*. Oboljenje se karakteriše inflamatornim promenama, pre svega, u respiratornom sistemu, a ponekad protiče i u generalizovanoj formi. Patomorfološki supstrat ovog oboljenja je mikotični granulom čija je najčešća lokalizacija u plućima i vazdušnim kesama. Kod čuraka, pataka i gušaka je zapažen i mikotični-granulomatozni meningoencefalitis sa pretežnom lokalizacijom na malom mozgu (Knežević, 1996; Ivetić i sar., 2003; Ozmen i Dorrestein, 2004; Singh i sar., 2009). Uporedna eksperimentalna ispitivanja osetljivosti različitih vrsta živine na *Aspergillus fumigatus* su pokazala da su čurke osetljivije od pilića. Kod mlađih kategorija infekcija *Aspergillus fumigatus* je obično akutnog toka sa visokim procentom morbiditeta i mortaliteta, dok se kod starijih kategorija ređe javlja i obično je hroničnog toka. Stopa mortaliteta se može kretati od 70 do 90%. Kliničkim pregledom je vrlo teško utvrditi da se radi o gljivičnoj infekciji pa u mnogim slučajevima ovo oboljenje ostaje nedijagnostikовано. Iz literaturе je poznato da dijagnoza gljivične infekcije kod živine vrlo često bude postavljena tek posle histopatološkog pregleda organa obolele živine (Richard i sar., 1984; Saif, 2008). Zbog toga za otkrivanje ovog oboljenja treba primeniti različite metode dijagnostike, počev od kliničkog pregleda jata, makroskopskog pregleda uginulih jedinki, izolacije uzročnika, kao i histohemijske i imunohistohemijske metode dokazivanja kako tkivnih lezija tako i razvojnih oblika samih gljivica. Od histohemijskih metoda, pored rutinskog bojenja hematoksilin-eozin metodom, primenjuju se i periodic acid-Schiff (PAS) kao i specifično bojenje za gljivice Grocott methenamine silver metod (GMS) (Ozmen i Dorrestein, 2004). Postoji mogućnost i upotrebe imunohistohemijske metode u kojoj se koriste monoklonska antitela protiv galaktomanana iz zida *A. fumigatus*, pri čemu ova metoda služi za istovremeno otkrivanje lezije i uzročnika (Jensen i sar., 1997).

Materijal i metode rada / Material and methods

Kao materijal za ispitivanje korišćeni su leševi 10 čurića starih 12 dana koji su poticali sa jedne farme sa severa Srbije. Od ukupnog broja čurića na farmi (7950 jedinki) uginulo je 405 jedinki (5,1%). Kliničkim pregledom jata je us-

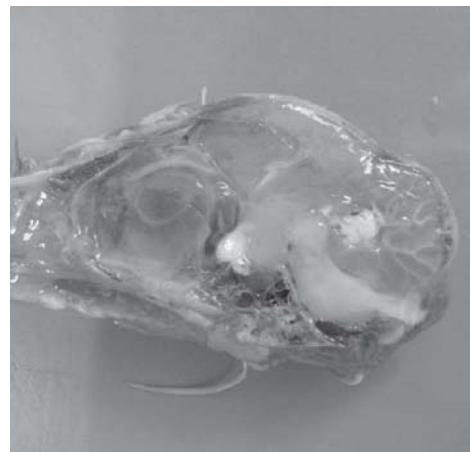
stanovljena umerena depresija pojedinih jedinki, ataksija, pareza i paraliza zadnjih ekstermiteta i krila i tremor skeletne muskulature. Uzimanje hrane je bilo smanjeno, što je dovelo do smanjenja dnevnog prirasta.

Posle obdukcije, za histopatološko i mikološko ispitivanje uzeti su uzorci moždanog tkiva. Uzorci moždanog tkiva za histopatološki pregled su fiksirani u 10% puferizovanom formalinu, procesovani standardnim postupkom i uklapljeni u parafinske blokove. Parafinski isečci tkiva debljine oko 5 µm bojeni su hematoksilin-eozin (HE), Grocott i PAS metodom. Uzorci moždanog tkiva za mikološko ispitivanje su inokulisani na Sabouraud dekstroznji agar i inkubisani na temperaturi od 25°C u aerobnim uslovima u svrhu izolacije infektivnog agensa. Da bi se izbegla bakterijska kontaminacija, podlozi je dodato 20 i.j./ml penicilina G i 40 µg/ml streptomycin sulfata. Makroskopska i mikroskopska ispitivanja izraslih kolonija su izvršena prema Quinn-u (2002).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Spoljašnjim pregledom leševa čurića ustanovljena je slabija operjalošta kože, naročito u području grudi, kao i kaheksija. Pri unutrašnjem pregledu, na mozgu su ustanovljene makroskopske lezije u vidu hiperemije krvnih sudova moždanih ovojnica, a u tri slučaja makroskopski nalaz je ukazao na granulomatozni encefalitis malog mozga. Granulom bele boje, prečnika oko 3 mm, bio je situiran kranioventralno i jasno se uočavao na sagitalnom preseku malog mozga (slika 1). Mada se aspergilozni granulomi (aspergilomii) najčešće javljaju na plućima ima i podataka o pojavi aspergiloma i na malom mozgu, upravo kod ove vrste ptica (Schulz, 1991; Ozmen i Dorrestein, 2004; Saif, 2008). Interesantno je da se granulomi javljaju ili na velikom ili na malom mozgu, dok se redje javljaju istovremeno na oba lokaliteta (Saif, 2008). Osim toga, kod svih ugnulih čurića su ustanovljeni hiperemija i edem pluća, dok na drugim organima nije bilo makroskopski vidljivih promena.

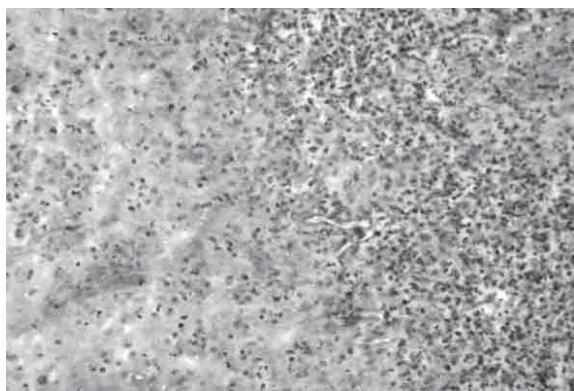
Mikološkim ispitivanjem izolovana je gljivica *Aspergillus fumigatus*. Rast na podlozi je bio uočen posle 24 sata, a nakon četiri dana izrasle su kolonije bele boje prečnika oko 2 cm. Do sedmog dana dijametar kolonije se povećao na 3,5 cm, a postepeno je došlo do promene boje u centralnom delu kolonije, prvo u plavozelenu, a potom u sivo-zelenu, dok su



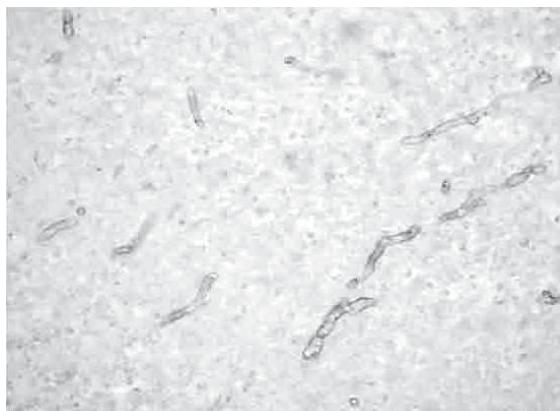
Slika 1. Granulom u malom mozgu čureta
Figure 1. Cerebellar granuloma in turkey chick

rubovi i dalje ostali bele boje. Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika kolonija, kultura je identifikovana kao *Aspergillus fumigatus*.

Mikroskopskim pregledom isečaka tkiva bojenih HE metodom, u tri slučaja je zapaženo postojanje granuloma u malom mozgu sa centralno postavljenim nekrotičnim poljem. Polja nekroze su infiltrirana heterofilnim granulocitima i okolo okružena makrofagima, džinovskim ćelijama i limfocitima. Na periferiji granuloma se nalazi vezivno-tkivna kapsula. Kraće i duže forme septiranih hifa su bile uočljive u nekrotičnim područjima (slika 2). Hife su se naročito isticale u isećcima moždanog tkiva bojenih PAS i Grocott metodom (slika 3 i 4).



Slika 2. Mali mozak čureta – Polje nekroze infiltrirano heterofilnim granulocitima okruženo makrofagima i limfocitima, HE, X400
Figure 2. Turkey chick cerebellum – Area of necrosis infiltrated with heterophilic granulocytes and surrounded by macrophage and lymphocytes, HE, X400



Slika 3. Mali mozak čureta – Kraće i duže forme septiranih hifa u nekrotičnom području, PAS, X400 /
Figure 3. Turkey chick cerebellum – Shorter and longer forms of septed hyphae in necrotic area, PAS, X400

U pet slučajeva u isečcima tkiva mozga bojenih HE metodom nisu uočene granulomatozne promene, već samo prisustvo manjeg ili većeg broja nekrotičnih ognjišta koja su istovremeno infiltrirana limfocitima, manjim brojem makrofaga, džinovskih ćelija i heterofilnih granulocita. Ovakve promene su u literaturi opisane kao rane lezije (Jensen i sar., 1997). U dva slučaja u uzorcima mozga bojenim HE metodom nisu ustanovljene patohistološke promene. Grocott i PAS metodom bojenja kod svih deset uzoraka je ustanovljeno prisustvo septiranih i razgranatih hifa. Prema tome, ovim metodama bojenja hife gljivica su ustanovljene i u onim slučajevima kada patohistoloških promena nije bilo, mada se u ovim slučajevima ne mogu isključiti inicijalne promene na supcelularnom nivou. PAS i Grocott bojenje se u literaturi opisuju kao vrlo pouzdane metode za direktnu vizuelizaciju razvojnih oblika gljivica u tkivima (Ozmen i Dorrestein 2004; Singh i sar., 2009).



Slika 4. Mali možak čureta – Septirane i dihotomo razgranate hife, Grocott, X400 /
Figure 4. Turkey chick cerebellum – Septed and dichotomously branched hyphae, Grocott, X400

Zaključak / Conclusion

Mikroskopski nalaz tipičnih mikotičnih granuloma u malom mozgu sa centralno postavljenom nekrozom i hifama okruženim makrofagama, džinovskim ćelijama, limfocitima i vezivno-tkivnom kapsulom ukazivao je na aspergiliozu, tim pre što su kod ispitivanih čurića klinički postojali nervni simptomi. Uz ovo, primenom Grocott i PAS metode u granulomu su ustanovljeni razvojni oblici gljivice *Aspergillus fumigatus*, što neosporno potvrđuje etiološku dijagnozu.

Literatura / References

1. Ivetić V, Valter D, Pavlović I, Miljković B, Maslić-Stržak D, Ilić Ž, Savić B, Stanojević S, Spalević LJ. Atlas bolesti živine, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, 2003.

2. Jensen HE, Christensen JP, Bisgaard M, Nielsen OL. Immunohistochemistry for diagnosis of aspergillosis in turkey pouls. *Avian Pathol* 1997; 26: 5-18.
3. Knežević N, Matejić M. Bolesti pernate živine. Veterinarska komora Srbije, Beograd, 1996.
4. Ozmen O, Dorrestein MG. Observations of aspergillosis in the brains of turkey pouls using different histopathological staining techniques. *Biotechnic and Histochimistry* 2004; 79(2): 95-9.
5. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Science Ltd., Iowa State University Press, 2002.
6. Richard JL, Thurston JR, Peden WM, Pinello C. Recent studies on aspergillosis in turkey pouls. *Mycopathologia* 1984; 87: 3-11.
7. Saif YM. Diseases of poultry. Twelfth edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 2008
8. Schulz LCL. Pathologie der Haustiere. Teil 1. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991.
9. Singh S, Borah MK, Sharma DK, Joshi GD, Gogoi R. Aspergillosis in turkey pouls. *Canadian J Vet Pathol* 2009; 33(2).

ENGLISH

IMPLEMENTATION OF DIFFERENT HISTOCHEMICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF BRAIN ASPERGILLOSIS IN TURKEY CHICKS

**B. Kureljušić, B. Savić, R. Prodanović, J. Đekić, V. Adamov, Dobrila Jakić-Dimić,
Biljana Miljković, O. Radanović, V. Ivetić**

Aspergillosis is a frequent fungal disease in different species of birds and mammals caused by fungi of the genus *Aspergillus*. It is characterized by inflammatory changes primarily in the respiratory system, even though it sometimes takes on a generalized form when several organ systems are affected. Mucotic-granulomatous meningoencephalitis with a predominant localization in the cerebellum has been described in turkeys, ducks and geese.

Within this paper, examinations have been performed on a flock of broiler turkeys aged 12 days who had sustained evident neurological disorders in the form of ataxy, torticollis, paresis, and paralysis of the hind extremities and wings.

In three of the ten autopsied chicks the macroscopic findings indicated granulomatous encephalitis of the cerebellum. A white-coloured granuloma, around 3mm in diameter, was situated cranoventrally and was clearly visible on the sagittal section of the cerebellum. Mucological examinations of the cerebellum lesion resulted in the isolation of the fungi *Aspergillus fumigatus*. Haematoxylin-eosin (HE), Grocott and PAS methods were used for the evaluation of histopathological changes and proving *Aspergillus fumigatus* hyphae. The microscopic examination of brain tissue sections stained with the HE method revealed the existence of a granuloma with a centrally placed necrotic area. The necrotic area was infiltrated with heterophilic granulocytes and surrounded by macrophage, giant cells and lymphocytes. A connective tissue capsule was located on the periphery of the granuloma. The fungi hyphae, as integral parts of the granuloma, were difficult to observe, and in some samples stained using the HE method they could not be seen at all. On the

other hand, sections stained using the Grocott and PAS methods showed prominent septed and branched hyphae in different parts of the granuloma.

With the objective of making an etiological diagnosis of mucotic diseases, it is necessary to apply several histochemical methods, in addition to isolation.

Key words: turkey chicks, histochemical methods, meningoencephalitis,
Aspergillus fumigatus

РУССКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ АСПЕРГИЛЛЁЗА МОЗГА У ИНДЮШАТ

Б. Курелюшич, Б. Савич, Р. Проданович, Й. Джекич, В. Адамов,
Добрила Якич-Димич, Биляна Милькович, О. Радованович, В. Иветич

Аспергиллёз - частое грибковое заболевание различных видов птиц и млекопитающих, вызванное грибками рода *Aspergillus*. Характеризуется инфламматорными изменениями, прежде всего, в респираторной системе, хотя иногда протекает и в обобщённой форме, когда аффектировано больше органических систем. У индеек, уток и гусей описан микотический-грануломатозный менингоэнцефалит с преобладающей локализацией в мозжечке.

В работе испытана стая откормленных индюшат старости 12 дней, у которых появились неврологические помехи в виде атаксии, кривошейности, пареза и паралича задних конечностей и крыльев.

У трёх из десяти вскрытых индюшат макроскопический результат указал на грануломатозный энцефалит мозжечка. Гранулы белого цвета, диаметра около 3 мм был помещен черепноживотно и ясно замечался на сагittalном разрезе мозжечка. Микологическим испытанием повреждения из мозжечка изолирован грибок *Aspergillus fumigatus*. Для оценки гистопатологических изменений и доказательство гиф *Aspergillus fumigatus* использованы гематоксилин-эозин (ГЭ), Grocott и PAS методы.

Микроскопическим осмотром вырезок тканей мозга, крашенных ГХ методом замечено существование гранулём с центрально поставленным некротическим полем. Поля некроза инфильтрированы гетерофильтальными гранулоцитами и окружены макрофагами, гигантскими клетками и лимфоцитами. На периферии гранулём находится соединительно-тканевая капсула. Гифы грибок, в качестве составных частей гранулём, были трудно заметны, а в некоторых образцах, крашенных ГХ методом не виделись. Напротив этому, в препаратах, крашенных Grocott и PAS методом ясно выделялись септированные и разветвленные гифы в различных частях гранулём.

С целью постановления этиологического диагноза микотических заболеваний необходимо возле изоляции применить и больше гистохимических методов.

Ключевые слова: индюшата, гистохимические методы, менингоэнцефалит,
Aspergillus fumigatus

**IDENTIFICATION OF SEROTONERGIC (5H_{1A}-TYPE)
RECEPTORS IN BROILER SMALL INTESTINE BY
APPLICATION OF SEROTONIN AND ITS AGONISTS
AND ANTAGONISTS***

*UTVRĐIVANJE SEROTONERGIČNIH RECEPTORA 5HT_{1A} TIPO U
TANKOM CRIJEVU BROJLERA PRIMJENOM SEROTONINA I
NJEGOVIH AGONISTA I ANTAGONISTA*

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

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a monoamine neurotransmitter synthesised from L-tryptophan in serotonergic neurons and enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract. This neurotransmitter is widely distributed in the animal and plant kingdom and regulates some central and peripheral functions through several types of specific serotonergic (5-HT) receptors. Since it is known that the effect of serotonin, especially in pathological conditions, is very important, we believe that determining the types of receptors for this substance would make it possible to use their agonist or antagonists, which would undoubtedly enhance the pharmacotherapy of functional disruption of the small intestine in broilers.

Investigations were carried out on isolated smooth muscle strips of the circular and longitudinal layer of the broiler small intestine (strip dimension 3-4 mm x 2 cm). The muscle strips were placed in an isolated organ bath. The mechanical activity of the preparations was recorded via an isotonic force transducer coupled to a pen recorder. This was done following the addition of serotonin (nonselective 5-HT agonist), 8-OH-DPAT (selective 5-HT_{1A} agonist) and spiroxatrin (selective 5-HT_{1A} antagonist). The sensitivity of the tissues to acetylcholine was tested before starting the experiments. Using the obtained results, it can be concluded that 5HT_{1A} type receptors are present in smooth

* Rad primljen za štampu 03. 03. 2011. godine

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

muscles of the broiler small intestine, duodenum and ileum, especially in the longitudinal smooth muscle layer which reacted with contractions even to low serotonin concentration (10⁻⁶), but not in the jejunum.

Key words: *broilers, serotonin, serotonergic receptors, isolated smooth muscle, small intestine*

Introduction / Uvod

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a monoamine neurotransmitter synthesized from L-tryptophan in serotonergic neurons and enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract. This neurotransmitter is widely distributed in the animal and plant kingdom. It occurs in vertebrates, tunicates, molluscs, arthropods and coelenterates and in edible fruits and nuts. It is also present in numerous venoms, includings those of the common stinging nettle and wasps and scorpions. About 95% of the serotonin in the body is found in the gastrointestinal tract, where it has been estimated that the total serotonin content is about 10 mg, 90% is in enterochromaffin cells and 10% in enteric neurons. The rest of 5-HT (5%) is found in the brain. Virtually all of the serotonin in the blood is derived from the GI tract. Serotonin is present in the enteric nervous system. Serotonergic neurons constitute about 2% of all myenteric neurons. Serotonin is released from the bowel when enteric nerves are stimulated. Serotonin is also an important constituent of platelets and coagulation of blood (Brunton, 2006; Rang *et al.*, 2007; Riviere and Papich, 2009).

In the gut, serotonin is released from enterochromaffin cells. It has diverse motor and sensory function in the GI tract through submucosal and myenteric neurons that respond to 5-HT initiated responses as diverse as nausea, vomiting, intestinal secretion and peristalsis, and plays a role in bowel physiology as an enteric neurotransmitter.

Serotonin produces its action by the effect on specific serotonergic (5-HT) receptors which are present in enteric neurons, enterochromaffin cells, GI smooth muscle and possibly on enterocytes and immune tissues. Seven types or families and multiple subtypes of 5-HT receptors have now been identified by a combination of pharmacological techniques and molecular cloning. The seven recognized types or families of 5-HT receptors are termed as 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇. The last three receptors (5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇) are distributed predominantly in the brain (Borne, 1994; Brunton, 2006; Meneses, 1998; Pauwels, 2003).

Many studies have indicated the involvement of various subtypes of 5-HT receptors in gastronintestinal motility and secretion regulation. Kojima *et al.* (1992), Meulemans *et al.* (1993) and Takemura *et al.* (1999) have shown that 5-HT₁ receptors mediate relaxation in guinea-pig proximal stomach *in vitro*. 5-HT₇ receptors are found to mediate relaxation in both distal (Prins *et al.*, 2001) and proxi-

mal (Janssen *et al.*, 2002) parts of the canine stomach. Data from *in vivo* studies have also indicated that 5-HT₁ receptors mediate relaxation, since sumatriptan (a 5-HT₁ receptor agonist) relaxed the proximal stomach of the cat (Coulie *et al.*, 1999) and man (Tack *et al.*, 2000). To date, it is not known what mechanism underlies this effect linked to 5-HT₁ receptors. Takemura *et al.* (1999) demonstrated that the 5-HT-induced contraction of guinea-pig fundus strips were antagonized by ketanserin, suggesting 5-HT_{2A} receptor involvement. 5-HT_{2A} receptors were also found to mediate contraction in the canine proximal stomach (Janssen *et al.*, 2002). However, rat gastric fundus contraction is mediated by 5-HT_{2B} receptors (Baxter *et al.*, 1994). 5-HT₃ receptors mediate stomach contraction in the guinea-pig *in vitro* (Buchheit and Buhl, 1994). In conscious dogs, m-chlorophenylbiguanide (a selective 5-HT₃ receptor agonist) stimulates antral motility (Nagakura *et al.*, 1997). 5-HT₄ receptor agonists potentiate electrically evoked contractions in the longitudinal muscle of dog gastric corpus (Prins *et al.*, 2001) and the circular muscle of the guinea-pig gastric fundus and corpus (Hegde and Eglen, 1996). Kitazawa *et al.* (2006) have shown that 5-HT causes contraction of the proventriculus via 5-HT_{2C}-like receptors present on the smooth muscle and contraction of the ileum in the chicken.

Since it is known that the effect of serotonin, especially in pathological conditions, is very important, we believe that determining the types of receptors for this substance is just as important since it would allow the use of their agonist or antagonists, which would undoubtedly enhance the pharmacotherapy of functional disruption of the small intestine in broilers. If we add that disturbances of bowel function are common in broilers, and if we know that this mentioned dysfunction causes great damages to the poultry industry due to the high mortality, the results of this research could form the basis for the introduction of new drugs in the pharmacotherapy of this species.

Material and methods / Materijal i metode rada

During the experiment the following drugs were used: acetylcholine, 5-hydroxytryptamine creatinine sulphate (non selective 5-HT agonist), 8-OH-DPAT hydrobromide (selective 5-HT_{1A} agonist) and spiroxatrin (selective 5-HT_{1A} antagonist). All substances were obtained from the Sigma Chemical Co. (Germany) and Tocris Cookson Ltd., (Bristol, UK). The material used in the experiment was the small intestine of poultry (broilers) strain Cobb 500 taken at the time of slaughter at a private poultry slaughterhouse. The gut was dissected and immediately placed in cold, freshly prepared Kreb's 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) and transferred to the laboratory for isolated organs. The experiments were performed with the smooth muscle of the circular and longitudinal layer from the broiler small intestine – duodenum, jejunum and ileum (strip dimension 3-4 mm x 2 cm). Segments were placed in a 10 ml bath for isolated organs filled with

Krebs bicarbonate solution, 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. The mechanical activity of the preparations was recorded via an isotonic force transducer (Ugo Basile, 7003, Italy) coupled to a pen recorder (Ugo Basile, 7050). All strips were studied on the day of preparation. The sensitivity of the tissues to acetylcholine (10⁻⁵ M) was tested before starting the experiments. All experiments were repeated on five to six different preparations obtained from different animals. Segments of the small intestine were incubated with serotonin, and its 5HT_{1A} agonist - 8-OH-DPAT hydrobromide, for 1 minute and the time between two applications was 20 minutes. Antagonist spiroxatrin was added to the bath 3-4 minutes before the agonists.

Rezultati / Results

Results are expressed as percentages of the maximum response (expressed as 100%) produced by acetylcholine on the longitudinal layer of the smooth muscle of broiler duodenum with a concentration of 10⁻⁵ M.

Serotonin (at a concentration of 10⁻⁷ to 10⁻³ M) and its analogue 8-OH-DPAT, (at a concentracion of 10⁻⁷ to 10⁻⁴ M) induced dose-dependent contraction in the isolated longitudinal layer of the smooth muscle of the duodenum and ileum of broilers. Neither the circular nor the longitudinal layer of the smooth muscle of the jejunum had significant results. The circular layer of the smooth muscle of the small intestine (duodenum and ileum) showed lower sensitivity to histamine and its agonist betahistine in equal concentrations as in the longitudinal layer (Fig. 1 and 2).

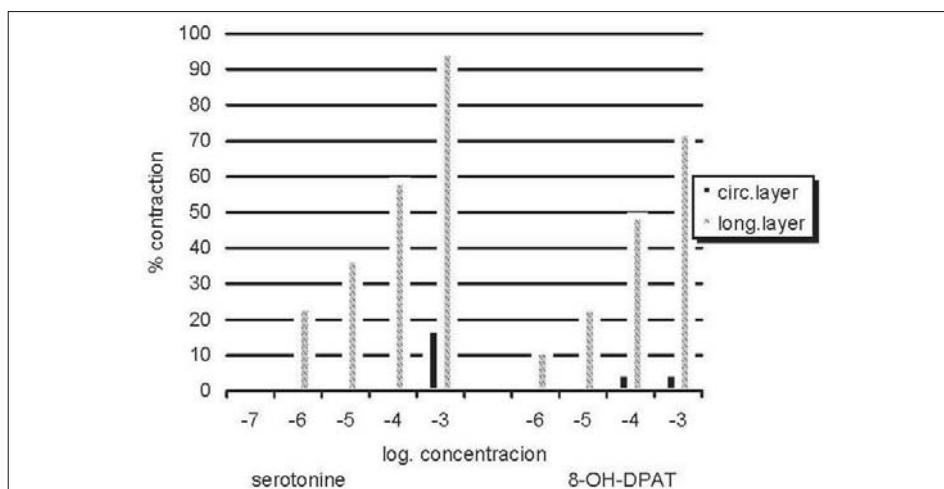


Figure 1. Effect of various concentrations of 5-HT and 8-OH-DPAT, on circular and longitudinal layer of smooth muscles of broiler duodenum. Contractions were expressed as percentage of muscle strip preparation to acetylcholine (10⁻⁵ M)

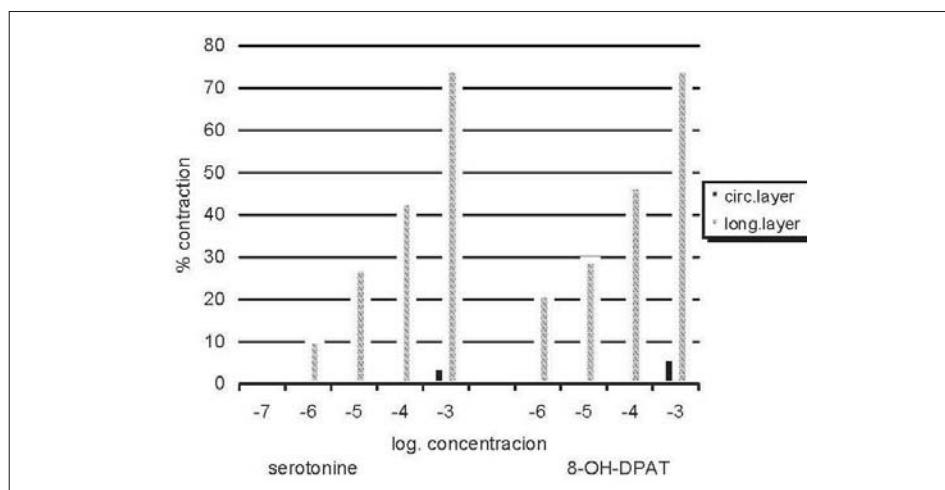


Figure 2. Effect of various concentrations of 5-HT and 8-OH-DPAT on circular and longitudinal layer of smooth muscles of broiler ileum. Contractions were expressed as percentage of muscle strip preparation to acetylcholine (10^{-5} M)

In the experiment designed to investigate effects of antagonists of 5-HT receptors, spiroxatrin (selective 5-HT₁ antagonist) was added in a concentration of 10^{-7} M to 10^{-4} M to antagonized 8-OH-DPAT-induced contraction at a concentration of 10^{-3} M (Fig. 3 and 4).

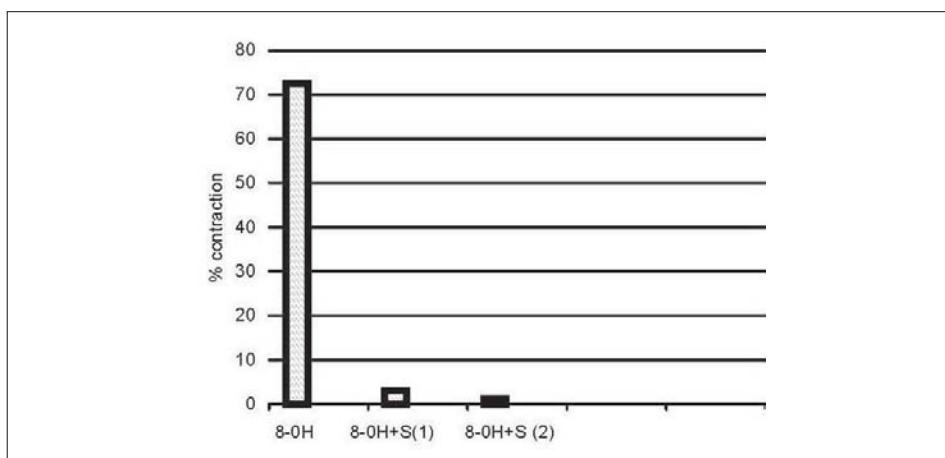


Figure 3. Contractile effect of 8-OH-DPAT (8-OH) on smooth muscles of duodenum alone and in presence of spiroxatrin (8-OH+S) in concentration of 10^{-6} M (1) and 10^{-5} M (2)

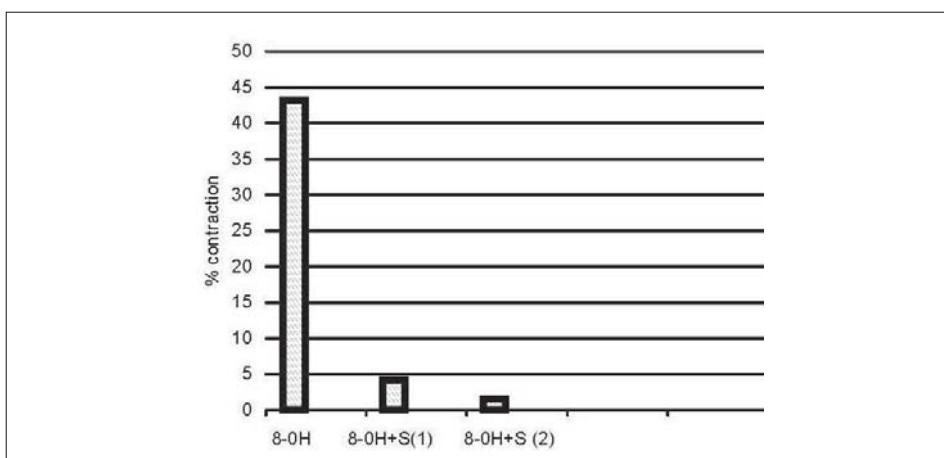


Figure 4. Contractile effect of 8-OH-DPAT (8-OH) on smooth muscles of ileum alone and in presence of spiroxatrin (8-OH+S) in concentration of 10⁻⁶ M (1) and 10⁻⁵ M (2)

Discussion and conclusion / Diskusija i zaključak

Between 80 and 90% of the total content of serotonin in the body is located in the gastrointestinal tract, i.e. enterochromaffin cells isolated from the stomach and intestines (Rang *et al.* 2007; Riviere and Papich, 2009). It is peripheral and the most evident effect of serotonin on smooth muscles of the gastrointestinal tract (Born, 1994, Rang *et al.*, 2007). Serotonin, among other substances, causes contractions of smooth muscles of the bovine rumen (Muminović *et al.*, 2000), regulates the motility of the digestive system, enhances secretion, etc. (Brunton, 2006; Hegde and Eglen, 1996; Rang *et al.*, 2007). A number of authors tried to identify the 5-HT₁ receptors subtypes in isolated smooth muscle of organs from the gastrointestinal tract, such as the bovine rumen (Muminović *et al.*, 2000), the porcine and human small intestine (Schworer and Ramadori, 1998), the rabbit ileum (Turabi *et al.*, 2006), the guinea-pig ileum (Buccheit and Buhl, 1993) etc., but not in smooth muscles of the broiler small intestine.

In our experiments, the circular layer of the smooth muscle of the broiler small intestine (duodenum and ileum) showed considerably lower sensitivity to serotonin and 8-OH-DPAT used in equal concentrations as in the longitudinal layer. Neither the circular nor the longitudinal layer of the smooth muscle of the jejunum had significant results.

In the first part of our experiment we used serotonin (non-selective 5-HT agonist) in concentrations from 10⁻⁷ to 10⁻³ M. Considering the obtained results, it can be concluded that serotonergic receptors are highly present in smooth muscles of the circular and longitudinal layer of the broiler small intestine.

With the increase in concentration, we obtained responses in the form of stronger (higher) intensity contractions.

In the next part of our experiment, we tried to determine the presence of 5HT₁ type receptor in intestinal smooth muscles of broilers. We used 8-OH-DPAT (selective 5HT_{1A} agonist) in concentrations from 10⁻⁷ to 10⁻³ M. In this *in vitro* study, 8-OH-DPAT evoked dose-dependent contractions on circular and longitudinal layers of the smooth muscle of the broiler small intestine (duodenum and ileum). Longitudinal muscles of the duodenum displayed about 15-25 % lower sensitivity to the same concentration than to serotonin, but longitudinal muscles of the ileum displayed the same sensitivity as to serotonin.

The 8-OH-DPAT effects (in a concentration of 10⁻³ M) on the longitudinal layer of the duodenum and ileum was blocked by spiroxatrin (selective 5HT₁ antagonist) in concentrations of 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M. Considering the obtained results, it can be concluded that a 5HT_{1A} type of receptor is present in the smooth muscle of both layers of the broiler duodenum and ileum, but not in the jejunum.

By summarizing all the effects in this assay, it can be concluded that 5HT_{1A} type receptors are present in smooth muscles of the broiler small intestine (duodenum and ileum), especially in longitudinal smooth muscles since this layer reacted with contractions even to low serotonin concentration (10⁻⁶). In the light of these findings, we suggest that the investigated substances may have considerable physiological and therapeutic implications in disturbed functions of the small intestine of broilers.

References / Literatura

1. Baxter GS, Murphy OE, Blackburn TP. Further characterization of 5-HT receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. Br J Pharmacol 1994; 112: 323-31.
2. Borne RF. Serotonin: The Neurotransmitter for the '90s. Drug Topics, 1994.
3. Brunton LL. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed., McGraw-Hill, 2006.
4. Buchheit KH, Buhl T. 5-HT receptor subtypes involved in the stimulatory effect of 5-HT on the peristaltic reflex *in vitro*. Neurogastroenterology & Motility 1993; 5(1): 49-55.
5. Buchheit KH, Buhl T. Stimulant effects of 5-hydroxytryptamine on guinea pig stomach preparations *in vitro*. Eur J Pharmacol 1994; 262: 91-7.
6. Coulie B, Tack J, Sifrim D, Andrioli A, Janssens J. Role of nitric oxide in fasting gastric fundus tone and in 5-HT₁ receptor-mediated relaxation of gastric fundus. Am J Physiol 1999; 276: 373-7.
7. Hedge SS, Eglen RM. Peripheral 5-HT₄ receptors. FASEB J 1996; 10: 1398-407.
8. Janssen P, Prins NH, Meulemans AL, Lefebvre RA. Pharmacological characterization of the 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of canine isolated proximal stomach smooth muscle. Br J Pharmacol 2002; 136: 321-9.

9. Kojima S, Ishizaki R, Shimo Y: Investigation into the 5-hydroxytryptamine-induced relaxation of the circular smooth muscle of guinea-pig stomach fundus. Eur J Pharmacol 1992; 224: 45-9.
10. Meneses A. Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT system in learning and memory. Rev Neurosci 1998; Abstract 9(4): 275-89.
11. Meulemans AL, Helsen LF, Schuurkes JA. The role of nitric oxide (NO) in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig stomach. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 1993; 348: 424-30.
12. Muminović M, Hadžović S, Indira Abdagić. The effect of serotonin on the isolated smooth muscles of the bovine rumen. Veterinaria 2000; 49(1-2): 65-77.
13. Nagakura Y, Ito H, Kamato T, Nishida A, Miyata K. Effect of a selective 5-HT3 receptor agonist on gastric motility in fasted and fed dogs. Eur J Pharmacol 1997; 327: 189-93.
14. Pauwels PJ. 5-HT Receptors and their Ligands. Tocris Reviews 2003; 25.
15. Prins NH, Van Der Grijn A, Lefebvre RA, Akkermans LMA, Schuurkes JA. 5-HT4 receptors mediating enhancement of contractility in canine stomach; an *in vitro* and *in vivo* study. Br J Pharmacol 2001; 132: 1941-7.
16. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Rang's and Dale's Pharmacology. Churchill Livingston. Sixth edition, 2007.
17. Riviere JE, Papich MG. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ninth edition. Wiley-Blackwell, 2009.
18. Schwörer H, Ramadori G. Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine *in vitro*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1998; 35(5) 548-52.
19. Tack J, Coulie B, Wilmer A, Andrioli A, Janssen J. Influence of sumatriptan on gastric fundus tone and on the perception of gastric distension in man. Gut 2000; 46: 468-73.
20. Takemura K, Takada K, Mameya S, Kaibara M, Taniyama K. Regional and functional differences of 5-hydroxytryptamine-receptor subtypes in guinea pig stomach. Jap J Pharm 1999; 79: 41-9.
21. Turabi A, Hasan SS, Danyal A, Baluch N. Role of 5HT in the modification of intestinal motility, *in vitro* study. J Pakistan Med Assoc 2006; 31: 1.

SRPSKI

UTVRĐIVANJE SEROTONERGIČNIH RECEPTORA 5H_{1A} TIPA U TANKOM CREVU BROJLERA PRIMENOM SEROTONINA I NJEGOVIH AGONISTA I ANTAGONISTA

Indira Mujezinović, V. Čupić, A. Amajlović, M. Muminović

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) je monoaminski neurotransmiter kojeg iz L-triptofana sintetišu serotonergični neuroni i enteroohrmofine ćelije gastrointestinalnog trakta. Ovaj neurotransmiter se nalazi kod velikog broja životinja i biljaka i reguliše neke centralne i periferne funkcije posredstvom nekoliko tipova specifičnih serotonergičnih (5-HT) receptora. Pošto je poznato da je efekat serotoninina, posebno u patološkim uslovima, veoma značajan, mi mislimo da određivanje tipa receptora za ovu supstancu može učiniti mogućom upotrebu njenih agonista ili antagonista, što bi nedvosmisleno povećalo farmakoterapiju poremećaja funkcije tankog creva kod brojlera.

Istraživanja su izvršena na izolovanim trakama glatkih mišića kružnog i uzdužnog sloja tankog creva brojlera (dimenzije trake 3-4 mm x 2 cm). Trake mišića su bile stavljane u kupatila za izolovane organe. Mehanička aktivnost preparata je registrovana pomoću izotoničnog transdžusera povezanog sa štampačem. Registrovanje je vršeno posle dodavanja serotonina (neselektivni 5-HT agonist), 8-OH-DPAT (selektivni agonist) i spiroksatrina (selektivni 5-HT_{1A} antagonist). Osetljivost tkiva na acetilholin testirana je pre početka eksperimenta. Imajući u vidu dobijene rezultate može se zaključiti da su receptori 5HT_{1A} tipa prisutni u glatkim mišićima tankog creva brojlera, duodenumu i ileumu, posebno u uzdužnom sloju glatkih mišića koji je reagovao kontrakcijama čak i na niske koncentracije serotonina (10^{-6}), ali ne i u jejunumu.

Ključne reči: brojler, serotonin, serotonergički receptori, izolovni glatki mišić, tanko crevo

РУССКИЙ

УТВЕРЖДЕНИЕ СЕРОТОНЭРГИЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 5H_{1A} ТИП В ТОНКОЙ КИШКЕ БРОЙЛЕРОВ ПРИМЕНЕНИЕМ СЕРОТОНИНА И ЕГО АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ

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

Серотонин или 5-гидрокситриптамин (5ГТ) монаминский нейротрансмиттер, которого из Л-триптофана синтезируются серотонэргичные нейроны и энтерохроматонкие клетки гастроинтестинального тракта. Этот нейротрансмиттер находится у большого числа животных и растений и регулирует некоторые центральные и периферические функции посредством нескольких типов специфических серотонэргичных (5-ГТ) рецепторов. Так как известно, что эффект серотонина, отдельно в патологических условиях, очень значительный, мы думаем, что определение типа рецептора для этой субстанции может сделать возможной употребление её агонистов или антагонистов, чтобы недвусмысленно увеличивало фармакотерапию расстройств функции тонкой кишки у бройлеров.

Исследования совершены на изолированных лентах гладких мышц кружного и продольного слоя тонкой кишки бройлеров (размеры ленты 3-4 мм x 2 см). Ленты мышц были кладываны в ванные для изолированных органов. Механическая активность препарата регистрирована с помощью изотонического трасдюсера, связанного с печатателем. Регистрация совершена после добавления серотонина (неселективный 5-ГТ агонист), 8-OH-DPAT (селективный агонист) и спироксатрина (селективный 5-HT_{1A} антиагонист). Чувствительность ткани на ацетилхолин тестирована до начала эксперимента. Имея в виду, полученные результаты можно сделать вывод, что рецепторы 5-HT_{1A} типа присутствующие в гладких мышцах тонкой кишки бройлеров, двенадцатиперстной кишке подвздошной кишке, отдельно в продольном слое гладких мышц, реагированный конракциями даже и на низкие концентрации серотонина (10^{-6}), но не в тощей кишке.

Ключевые слова: бройлеры, серотонин, серотонэргические рецепторы, изолированная гладкая мышца, тонкая кишка

ISPITIVANJA VARIJABILNOSTI MORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA BUŠE I GATAČKOG GOVEDA U CILJU OČUVANJA AUTOHTONOG GENOMA^{*}

INVESTIGATIONS OF VARIABILITY OF MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS IN BUSA AND GATACKO CATTLE IN ORDER TO PRESERVE AUTOCHTHONOUS GENOME

Biljana Rogić, B. Važić, S. Jovanović, Marina Stamenković-Radak,
Mila Savić, I. Ravić^{**}

U cilju proučavanja i zaštite genoma autohtonih rasa goveda, izvršena su ispitivanja varijabilnosti morfometrijskih karakteristika buše i gatačkog govečeta, kao i retrospektivna analiza razvoja ispitivanih populacija. Istraživanjem je obuhvaćeno 97 krava i to 22 grla zapadnohercegovačke buše, 24 grla istočnohercegovačke buše i 51 grlo gatačkog goveda. Ispitivane su morfometrijske mere: visina do vrha grebena, dužina trupa, obim cevanice i obim grudi. Dobijeni podaci su statistički obrađeni, a utvrđivanje varijabilnosti je vršeno prostom analizom varijance sa nejednakim brojem ponavljanja. Značajnost dobijenih razlika sa tri istraživana lokaliteta je testirana F i t-testom. Utvrđen je značajan stepen varijabilnosti morfoloških karakteristika unutar ispitivanih populacija, kao i između populacija. Utvrđene razlike pre svega su rezultat uticaja različitih prirodnih uslova i uslova gajenja kao i udela genoma alpskih goveda, sa kojima je buša ukrštana.

Ključne riječi: buša, gatačko govedo, morfometrijske karakteristike, biodiverzitet

* Rad primljen za štampu 01. 03. 2011. godine

** Dipl. inž. Biljana Rogić, asistent, dr Božo Važić, docent, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjaluci, Republika Srpska, BiH; dr Slobodan Jovanović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; dr Mila Savić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr vet. med. Ivica Ravić, Udruga za zaštitu i očuvanje izvornih pasmina domaćih životinja, Široki Brijeg, BiH

Uvod / Introduction

U Evropi je počev od 18. veka, došlo do značajnog povećanja broja rasa goveda, većinom kombinovanih proizvodnih svojstava, najčešće dobro adaptiranih na lokalne uslove gajenja. Tokom druge polovine 20. veka, govedarska proizvodnja postala je intenzivna i specijalizovana. Favorizovanje visokoproduktivnih rasa goveda dovelo je do toga da se govedarska proizvodnja u svetu bazira na relativno malom broju visokoproduktivnih rasa, što je direktno dovelo do redukcije biodiverziteta. Sobzirom na to da se veliki broj rasa goveda gaji u malom broju, mnoge rase nalaze se na listi ugroženih ili čak nestalih rasa. Imajući u vidu značaj lokalnih i regionalnih rasa goveda za razvoj ruralnih sredina kao i za socijalno i kulturno naslede jedne regije, započet je proces očuvanja rasa (International agreements Convention on Biological Diversity CBD, 1992, FAO). Zaštiti autohtonih rasa goveda u Evropi poklanja se velika pažnja, s obzirom na to da predstavljaju važne elemente agro-biodiverziteta i agro-ekosistema, pri čemu se programi većinom baziraju na racionalnom korišćenju autohtonih rasa u samodrživim sistemima (Hiemstra, 2010; Martin-Colado, 2010; EURECA Consortium 2010).

Buša (*Bos brahyceros Adametz*) je rasa koja se tradicionalno gaji na području Balkana. Pre uvođenja savremenih, egzotičnih rasa, govedarska proizvodnja u Hercegovini bazirala se na uzgoju buše i gatačkog govečeta.

Gatačko goveče je lokalna rasa koja je nastala krajem 19. veka oplemenjivanjem populacija buše, na različitim lokalitetima u cilju poboljšanja proizvodnih osobina. Kao melioratori korišćena su siva alpska goveda, pincgavska rasa i smeđa-alpska goveda, koja potiču iz oblasti koje su po geografskim, klimatskim i drugim karakteristikama bile slične istočnoj Hercegovini. Najbolje rezultate u pogledu proizvodnje i otpornosti davali su melezi sivog tirolskog govečeta i autohtone buše. Dobijeno je gatačko goveče, lokalna rasa nešto većeg formata od buše, kod kojeg telesna masa krava iznosi 285-300 kg, a bikova 500 kg. Proizvodnja mleka varira od 1.600 do 2.500 kg (Likar, 1991).

Danas su, zbog sve veće upotrebe visokoproduktivnih rasa, populacije autohtonih rasa i sojeva drastično smanjene. Na prostorima Hercegovine gaji se mali broj grla koja po svom fenotipu odgovaraju buši. Prema sistemu klasifikacije definisanom u dokumentu "The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture (FAODAD-IS 2007)", buša pripada regionalnim graničnim rasama sa ugroženim statusom. Preporuke koje se odnose na zaštitu autohtonih rasa goveda ("The art in the management of animal genetic resources", FAO 2007) posebnu pažnju posvećuju karakterizaciji autohtonih rasa i utvrđivanju faktora koji bitno utiču na redukciju lokalnih, odnosno regionalnih rasa u pojedinim oblastima. Karakterizacija rase predstavlja sintezu velikog broja podataka koji se odnose na: proučavanje fenotipskih, bitnih rasnih odlika, molekularno-genetičke studije koje pružaju objektivnu procenu diverziteta unutar i iz-

među rasa, kao i podatke o specifičnim genetičkim odlikama, podatke o genetičkoj izolaciji u prošlosti, kao i podatke o kulturnom i istorijskom značaju rase.

U cilju karakterizacije autohtonih rasa goveda, izvršena je procena eksterijera na osnovu telesnih merenja, koja omogućavaju objektivnu ocenu razvijenosti pojedinih regija i procenu harmoničnosti građe životinja. Takođe, podaci o morfološkim odlikama omogućavaju da se kroz duži vremenski period prate karakteristike telesne građe populacija, uticaj priplodnjaka na potomstvo, kao i uticaj uslova držanja na telesnu građu jedinki u populaciji.

Za karakterizaciju morfoloških odlika buše i gatačkog govečeta od velikog značaja su ranije vršena ispitivanja (Rako, 1955; Ilančić, 1952; Popović, 1979; Telalbašić, 1979; Ivanković, 1997), koja pružaju dobru osnovu za procenu razvoja rase, varijabilnosti morfoloških osobina u okviru različitih populacija, kao i predlaganje strategije uzgoja autohtonog genoma goveda.

Materijal i metode rada / Material and methods

Istraživanje je obavljeno na 97 krava, tipa buše i gatačkog goveda, podeljenih u tri grupe. Prvu grupu čini 51 grlo rase gatačko goveče (poljoprivredno dobro u Gackom). Drugu grupu čine 24 grla rase buše sa područja istočne Hercegovine. Treću grupu čine 22 grla rase buša sa područja zapadne Hercegovine (Udruga za zaštitu i očuvanje izvornih pasmina domaćih životinja Široki Brijeg). Kod grla su merene četiri morfometrijske karakteristike i to: visina do vrha grebena, dužina trupa, obim grudi i obim cevanice. Visina i dužina grla merene su Lydtinovim štapom, a mere obima su merene pantljkom.

Za svaku uzetu morfometrijsku karakteristiku urađena je statistička obrada podataka. Modelom proste analize varijance sa nejednakim brojem ponavljanja upoređene su grupe goveda na osnovu dobijenih eksterijernih mera gdje su postojeće razlike unutar i između grupa testiranih pomoću F i t-testa.

Rezultati / Results

Statistička obrada podataka visine do vrha grebena prikazana je u tabeli 1. Utvrđena prosečna vrednost visine do vrha grebena za grupu I je 123,67 cm, za grupu II je 114,21 cm, a za grupu III je 106,11 cm. Rezultati analize varijance su pokazali da postoji statistički značajna razlika u prosečnoj visini do vrha grebena unutar istraživane grupe goveda.

Statistička obrada podataka dužine trupova prikazana je u tabeli 2. Utvrđena prosečna vrednost dužine trupa za grupu I je 136,86 cm, za grupu II je 126,71 cm, a za grupu III je 117,82 cm. Rezultati analize varijance su pokazali statistički visoku razliku u dužini trupa unutar posmatrane grupe.

Tabela 1. Analiza varijance za mere visine do vrha grebena za ispitivane grupe goveda sa rezultatima dobijenim F i t-testom /
Table 1. Variant analysis for exterior measurements of height at withers in investigated cattle populations with applied F test and T-test

| Grupa / Group | \bar{x}_i | $F_{izr.} / F_{cal.}$ | F_{tab} / F_{tab} | tizračunato / $T_{calculated}$ | ttablično1-2 / $t_{table1-2}$ | ttablično1-3 / $t_{table1-3}$ | ttablično2-3 / $t_{table2-3}$ | |
|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| I | 123,67 | 147,93** | 3,09 | 4,82 | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_3}$ 16,06** | 0,05 2,02 | 0,01 2,72 | 0,05 1,99 |
| II | 114,21 | | | | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_2}$ 5,96** | | | 2,76 1,99 |
| III | 106,11 | | | | | | | 2,69 |

Tabela 2. Analiza varijance za mere dužine trupa za ispitivane grupe goveda sa rezultatima dobijenim F i t-testom /
Table 2. Variant analysis for exterior measurements of body length in investigated cattle populations with applied F test and t-test

| Grupa / Group | \bar{x}_i | $F_{izr.} / F_{cal.}$ | F_{tab} / F_{tab} | tizračunato / $T_{calculated}$ | ttablično1-2 / $t_{table1-2}$ | ttablično1-3 / $t_{table1-3}$ | ttablično2-3 / $t_{table2-3}$ | |
|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| I | 136,86 | 82,26** | 3,09 | 4,82 | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_3}$ 12,89** | 0,05 2,02 | 0,01 2,70 | 0,05 1,99 |
| II | 126,71 | | | | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_2}$ 7,97** | | | 2,78 1,99 |
| III | 117,82 | | | | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_3}$ 4,03** | | | 2,73 |

Tabela 3. Analiza varijance za mere obima grudi za ispitivane grupe goveda sa rezultatima dobijenim F i t-testom /
Table 3. Variant analysis for exterior measurements of chest girth in investigated cattle populations with applied F test and t-test

| Grupa / Group | \bar{x}_i | $F_{izr.} / F_{cal.}$ | F_{tab} / F_{tab} | tizračunato / $T_{calculated}$ | ttablično1-2 / $t_{table1-2}$ | ttablično1-3 / $t_{table1-3}$ | ttablično2-3 / $t_{table2-3}$ | |
|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| I | 174,22 | 68,81** | 3,09 | 4,82 | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_3}$ 10,98** | 0,05 3,57** | 0,01 2,02 | 0,05 2,70 |
| II | 167,00 | | | | $t_{\bar{x}_i - \bar{x}_2}$ 7,38** | | | 1,99 2,78 |
| III | 148,55 | | | | | | | 2,73 1,99 |

Tabela 4. Analiza varijance za mere obima cevанице за ispitivane grupe goveda sa rezultatima dobijenim F i t-testom /
Table 4. Variant analysis for external measurements for foot circumferences in investigated cattle populations with applied F test and t-test

| Grupa / Group | \bar{x}_i | $F_{izr.} / F_{cal.}$ | F_{tab} / F_{tab} | $t_{izračunato} / T_{calculation}$ | $t_{izračunato-2} / t_{table1-2}$ | $t_{tablično1-3} / t_{table1-3}$ | $t_{tablično2-3} / t_{table2-3}$ |
|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| I | 18,76 | 244,55** | 0,05 3,09 | 0,01 4,82 | $t_{\bar{x}_1-\bar{x}_3}$ 20,82** | 0,05 2,02 | 0,01 2,69 |
| II | 15,71 | | | | 13,84** 6,16** | | |
| III | 14,09 | | | | | | |

Tabela 5. Poređenje rezultata prethodnih istraživanja sa dobijenim rezultatima /
Table 5. Comparison of results of previous investigations with obtained results

| Eksterijerne mere / External measurements | Buša / Buša (Popović, 1979) | Buša zapadna Hercegovina, grupa III / Buša western Herzegovina, group III (Rogić, 2011) | Stolačka buša / Stolačka Buša (Ilančić, 1952) | Buša istočna Hercegovina, grupa II / Buša eastern Herzegovina, group II (Rogić, 2011) | Gatačko govedo / Gatačko cattle Pejanović, 1961) | Gatačko govedo / Gatačko cattle (Rogić, 2011) |
|---|-----------------------------|---|---|---|--|---|
| Visina do grebena / Height at withers | 99,26 | 106,11 | 105,47 | 114,21 | 112,07 | 123,67 |
| Dužina trupa / Body length | 122,87 | 117,55 | 118,73 | 126,71 | 128,85 | 136,86 |
| Obim grudi / Chest girth | 152,17 | 148,55 | 153,90 | 167,00 | 151,41 | 174,22 |
| Obim cevанице / Foot circumference | 13,91 | 14,09 | 15,10 | 15,71 | — | 18,76 |

Statistička obrada podataka obima grudi prikazana je u tabeli 3. Dobijena prosečna vrednost obima grudi za grupu I je 174,22 cm, za grupu II 167,00 cm a za grupu III 148,55 cm. Rezultati analize varijance za mere obim grudi, kao i u prethodnim merenjima, pokazali su velike varijacije unutar posmatrane grupe.

Statistička obrada podataka obima cevanica prikazana je u tabeli 4. Utvrđena prosečna vrednost obima cevanice za grupu I je 18,76 cm, za grupu II je 15,71 cm, a za grupu III je 14,09 cm. Rezultat F-testa ukazuje na to da postoje statistički značajne razlike vrednosti ove morfometrijske karakteristike unutar posmatrane grupe.

S obzirom na to da je analiza varijance za sve četiri eksterijerne mere pokazala da postoji statistički značajna razlika unutar posmatrane grupe goveda, urađen je t-test s ciljem da se utvrdi koja se od tri ispitivane populacije razlikuje u posmatranim eksterijernim merama. T-test je u sva četiri slučaja pokazao da postoji visoka značajnost razlika srednjih vrednosti između svih kombinacija.

Diskusija / Discussion

Ispitivanja varijabilnosti rase buša sa različitim lokalitetima i gatačkog govečeta na osnovu spoljnih odlika ukazala su na značajne razlike u morfološkim odlikama. Takođe su utvrđene morfološke promene koje su nastale sa razvojem rase na različitim lokalitetima.

Morfometrijskom analizom je utvrđeno da je buša sa lokaliteta zapadne Hercegovine, malog telesnog okvira i da je po morfološkim karakteristikama najsličnija buši sa područja Šar-planine (Memiši, 2009). Na osnovu retrospektivne analize razvoja rase može se videti da je kao posledica neadekvanih uslova ishrane, došlo do zakržljavanja rase i da je u proteklih 30 godina (Popović i sar., 1979) visina do vrha grebena smanjena za 6,85 cm. Poređenjem dobijenih rezultata sa istraživanjima koja su sprovedena 50-tih godina prošlog veka (Ilančić, 1952; Rako, 1955) može se zaključiti da savremeniji tip buše ovog lokaliteta najviše liči na bušu koja se gajila pre 60 godina u ovoj oblasti.

Buša sa područja istočne Hercegovine ima veći obim tela u odnosu na bušu zapadne Hercegovine, odnosno u pogledu obima tela se nalazi u sredini u odnosu na bušu zapadne Hercegovine i gatačkog govečeta. Poredajući rezultate Ilančića i sar. (1952) koji su analizirali morfometrijske karakteristike buše sa područja istočne Hercegovine, vidi se da je tokom proteklih 60 godina gajenja došlo do poboljšanja telesne građe populacije buše u celini (tabela 5).

Gatačko goveče karakterišu veći obim tela i bolja proizvodna svojstva u odnosu na bušu. Poređenjem rezultata Pejanovića i sar. (1961) sa dobijenim rezultatima, može se videti da je tokom prethodnih 50 godina došlo do razvoja rase i povećanja obima tela, što je potvrđeno i ispitivanjima Važića i sar. (2007). Poređenjem morfometrijskih karakteristika sive tirolske rase goveda, koja je korišćena za stvaranje gatačkog govečeta (Rako i sar., 1955; Ivanković 1977; Telalbašić i sar., 1979) može se videti da je format savremenog gatačkog goveda isti ili veći u od-

nosu na sivo tirolsko govedo. Povećanje formata gatačkog govečeta nastalo je kao rezultat primene zootehničkih mera i poboljšanih uslova držanja i nege na području istočne Hercegovine.

Značajnost razlike posmatranih eksterijernih mera (t- testa) između svih kombinacija ispitivanih populacija goveda može se objasniti različitom genetičkom strukturu (buša i gatačko goveče) i velikim uticajem paragentskih faktora, koji su naročito uticali na pojavu varijabilnosti u eksterijernim odlikama populacija buše sa različitim lokalitetima.

Buša zapadne Hercegovine, koja ima najniže vrednosti posmatranih eksterijernih mera, gaji se u najoskudnijim uslovima smeštaja i ishrane, reljef je krševit, sa malo pašnjačkih površina. Način ishrane je ekstremno ekstenzivan, zasniva se na slobodnoj ispaši i kabastoj hrani u zimskom periodu. Buša istočne Hercegovine, gaji se u nešto povoljnijim uslovima smještaja i ishrane. Ovaj lokalitet karakteriše pretežno krševit reljef, ali sa više pašnjačkih površina. Gatačka goveda, koja su najkrupnija po svojim eksterijernim merama, gaje se na "PD Gacko", u povoljnijim uslovima držanja.

Zaključak / Conclusion

Utvrđen je visok stepen varijabilnosti morfoloških karakteristika unutar ispitivanih rasa, kao i razlike između rasa. Utvrđene razlike su pre svega rezultat uticaja različitih prirodnih uslova i uslova gajenja kao i udela genoma alpskih goveda, sa kojima je buša ukrštana. Rezultati predstavljaju značajan doprinos karakterizaciji postojećih populacija buše u odnosu na populacije buše u prošlosti. Dalja ispitivanja genomskeh karakteristika buše, zasnovana na molekularnim markerima pokazaće u kojoj meri je populacija buše danas očuvana u svom izvornom obliku.

Literatura / References

1. Bennewitz J, Simianer H, Meuwissen T. Combining local breeds in conservation schemes. Proceeding of the 60th EAAP; August, Barcelona, Wageningen Academic Publishers, 2009; 6-7.
2. Convention on Biological Diversity, Importance of conservation and sustainable use of genetic resources International agreements. CBD, 1992.
3. EURECA project. "Local cattle breeds in Europe: Development of policies and strategies for self-sustaining breeds". Proceeding of the 61st EAAP. August, Heraklion, Wageningen Academic Publishers 2010; 77-8.
4. FAO. The art in the management of animal genetic resources. In: The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, 2007.
5. FAODAD-IS <http://www.fao.org/dad-is/index.htm>.
6. Hiemstra SJ. Towards (self) sustainability of local cattle breeds in Europe. Proceeding of the 61st EAAP; August, Heraklion, Wageningen Academic Publishers, 2010; 105-6.

7. Ivanković A. Značajke sivog goveda u Hrvatskoj. Stočarstvo 1997; 51: 323-34.
8. Ilinčić D. Gatačko govedo-vrelo za oplemenjivanje naše buše. Stočarstvo 1952; 4:147-53.
9. Likar R. Veterinaria 1991; 40: 1-20.
10. Martin-Colado D, Diaz C, Choroszy Z. An integrated view of technical, economic and social factors influencing sustainability of sixteen local European cattle breeds. Proceeding of the 60 EAAP; August, Barcelona, Wageningen Academic Publishers. 2009: 77-8.
11. Memiši N, Bauman F, Pavloy B. Morfometrijske karakteristike populacije krava rase buša sa područja Šarplanine. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomija 2009; 15: 89-94.
12. Pejanović R. Uticaj sivotiolskog goveda sjevernoistočne Hercegovine. Doktorska disertacija, Sarajevo 1961.
13. Popović R, Vidović Z, Nakić S. Pasminski sastav i tjelesna građa krava opštine Mostar. Stočarstvo, 1979; 89-94.
14. Rako A. Siva i smeđa alpska pasmina goveda. Stočarstvo 1955; 9:101-5.
15. Telalbašić R, Pejanović R, Čaučević Z, Sučić B. Tipološke i eksterijerne karakteristike konja, goveda i ovaca u opština Duvno, Kupres i Prozor. Savjetovanje o problemima stočarstva brdskoplanskog područja Jugoslavije, Mostar 1979; 163-73.
16. Važić B, Drinić M, Kasagić D, Erbez M, Kralj A, Rogić B. Morfometrijske karakteristike gatačkog goveda. Agroznanje 2007; 8(3): 53-60.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF VARIABILITY OF MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS IN BUSA AND GATACKO CATTLE IN ORDER TO PRESERVE AUTOCHTHONOUS GENOME

Biljana Rogić, B. Važić, S. Jovanović, Marina Stamenković-Radak, Mila Savić,
I. Ravić

With the objective of studying and protecting genomes of autochthonous breeds of cattle, investigations were performed of the variability of morphometric characteristics of the autochthonous breeds Busa and Gatacko cattle, as well as a retrospective analysis of the development of the examined populations. The investigations covered 97 cows, specifically 22 head of western Herzegovina Busa cattle, 24 head of eastern Herzegovina Busa cattle, and 51 head of Gatacko cattle. Morphometric measurements were examined: height at withers, body length, foot circumference, and chest girth. The obtained data were processed statistically, and variability was established using simple variance analysis with an unequal number of repetitions. The significance of the obtained differences from the three investigated localities was tested using the F test and t-test. A significant degree of variability was established for the morphological characteristics within the examined populations, as well as between the populations. The established differences are primarily a result of the influence of different natural conditions and breeding conditions, as well as the genome share of Alpine cattle, with which the Busa has been cross-bred.

Key words: *Busa, Gatacko cattle, morphometric characteristics, biodiversity*

РУССКИЙ

**ИСПЫТАНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
БУШИ И ГАТАЧКОЙ ГОЛОВЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ЦЕЛЬЮ
СОХРАНЕНИЯ АВТОХТОННОГО ГЕНОМА**

**Биляна Рогич, Б. Важич, С. Йованович, Марина Стаменкович-Радак,
Мила Савич, И. Равич**

С целью изучения и охраны генома автохтонных пород крупного рогатого скота, совершены испытания изменчивости морфометрических характеристик буши и гатачкой головы крупного рогатого скота, словно и ретроспективного анализа развития испытываемых популяций. Исследованием охвачено 97 коров а именно 22 головы западногерцеговинской буши, 24 головы восточногерцеговинской буши и 51 голова гатачкой головы крупного рогатого скота. Испытываны морфометрические меры: высота до верха гребени, длина туловища, объём голени и объём грудей. Полученные данные статистически обработаны, а утверждение изменчивости совершено простым анализом варианта с неодинаковым числом повторения. Значительность полученных разниц с трёх исследованных мест тестируется с ф и т тестом. Утверждена значительная степень изменчивости морфологических характеристик внутри испытываемых популяций, словно и среди популяций. Утверждены разницы прежде всего результат воздействия различных природных условий разведения словно и доли генома альпийского крупного рогатого скота, с которым буша скрещивана.

Ключевые слова: буша, гатачкая голова крупного рогатого скота,
морфометрические характеристики, биоразнородность

PREDVIĐANJE RESORPCIJE I FARMAKOKINETIČKOG
PROFILA KARBAMAZEPINA IZ TABLETA SA
KONTROLISANIM OSLOBAĐANJEM KOD LJUDI
KORIŠĆENJEM MODELA KUNIĆA*

*PREDICTING ABSORPTION AND PHARMACOKINETIC PROFILE OF
CARBAMAZEPINE FROM CONTROLLED-RELEASE TABLET
FORMULATION IN HUMANS USING RABBIT MODEL*

Irena Homšek, Dragica Popadić, Slobodanka Simić, Slavica Ristić,
Katarina Vučićević, Branislava Miljković**

Farmaceutske formulacije sa kontrolisanim oslobođanjem imaju nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne dozirane oblike sa trenutnim oslobođanjem iste lekovite supstance. To se pre svega ogleda u redukovanoj učestalosti doziranja, smanjenoj pojavi i/ili intenzitetu neželjenih efekata, većoj farmakološkoj selektivnosti, redukovanoj fluktuaciji lekovite supstance u plazmi i boljoj podnošljivosti. Kada se posle završene registracije preparat nade na tržištu, može se javiti potreba za manjim izmenama u formulaciji. U isto vreme on treba da ostane efikasan i bezbedan za pacijente, što može biti potvrđeno na osnovu koncentracije lekovite supstance u plazmi i farmakokinetičkih podataka. Poseban izazov predstavlja predviđanje resorpcije i farmakokinetičkih osobina lekovite supstance kod ljudi na osnovu određivanja *in vitro* brzine rastvaranja i farmakokinetičkih podataka dobijenih ispitivanjem na životinjskom modelu. Zbog toga je cilj ovog ispitivanja bio da se uspostavi korelacija farmakokinetičkih parametara između modela kunića i humanog modela za formulacije tableta sa kontrolisanim oslobođanjem karbamazepina (KBZ) kao i *in vitro* *in vivo* korelacija zasnovana na predviđenoj frakciji resorbovanog leka. I pored uočenih razlika u srednjim profilima plazma koncentracija, rezultati koji se odnose na predviđenu frakciju resorbovane lekovite supstance bili su gotovo identični. Na osnovu toga se može zaključiti da se kunić

* Rad primljen za štampu 09. 12. 2010. godine

** Irena Homšek, dr sci. med. farmacije, Dragica Popadić, mr sci. inž. tehnologije, Slobodanka Simić, Slavica Ristić, dr sci. biohemiske nauke, Galenika a.d., Institut za istraživanje i razvoj, Beograd; Katarina Vučićević, dr sci. med. farmacije, Branislava Miljković, dr sci. med. farmacije, profesor, Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakokinetiku, Univerzitet u Beogradu, Srbija

može koristiti kao reprezentativan in vivo model za predviđanje farmakokinetičkih karakteristika formulacije sa kontrolisanim oslobađanjem KBZ kod ljudi.

Ključne reči: karbamazepin, tablete sa kontrolisanim oslobađanjem, ljudi, in vitro in vivo korelacija, farmakokinetika, kunići

Uvod / Introduction

Karbamazepin (KBZ) (5H-dibenzo [b, f] azepin-5-karboksamid) je triciklični lipofilni molekul, veoma zastupljen u tretmanu epilepsije, sam ili u kombinaciji sa drugim antiepileptičnim lekovima. Karbamazepin se pokazao kao veoma efikasan u tretmanu jednostavnih i kompleksnih parcijalnih i generalizovanih toničnokloničnih napada. Ovaj lek se takođe koristi u lečenju sindroma hronične boli i trigeminalne neuralgije, kao i kod različitih psihiatrijskih bolesti (McNamara, 1996). Karbamazepin se relativno sporo apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a apsorbovan se veoma brzo distribuira u sva tkiva. Njegova bioraspoloživost nakon oralnog uzimanja procenjuje se na više od 70%, dok je 75% vezano za proteine plazme (Martindale, 2009).

Strukture sa kontrolisanim otpuštanjem (CR-controlled release) daju nekoliko prednosti nad oblicima sa trenutnim oslobađanjem (IR-immediate release), uključujući smanjenje učestalosti doziranja, smanjene pojave i/ili inteziteta neželjenih efekata, veću farmakološku selektivnost, redukovana fluktuaciju lekove supstance u plazmi, produžen terapijski učinak i bolju podnošljivost (Malinowski i Marroum, 1999).

Struktura karbamazepina sa kontrolisanim oslobađanjem obezbeđuje stalnu koncentraciju (steady-state) karbamazepina u krvi (Stivens i sar., 1998) i omogućuje pacijentima bolju terapijsku podnošljivost i redukuje sporedne efekte izazvane promenama koncentracije leka, čineći antiepileptičnu terapiju efikasnijom (Bialer i sar., 1998; Wilding i sar., 1991).

Kad se posle registracije proizvod nađe na tržištu, može se javiti potreba za manjim izmenama u formulaciji. Ove modifikacije zahtevaju primenu najnovijih saznanja iz oblasti razvoja u proces proizvodnje i uključuju zamenu aktivne komponente ili ekscipijenata, podešavanje opreme ili modifikaciju plana proizvodnje (European Comission, 2003). Ove izmene zahtevaju potvrdu kvaliteta finalnog proizvoda kao i potvrdu stabilnosti prizvoda. U isto vreme, proizvod treba da ostane efikasan i bezbedan za pacijenta, što se potvrđuje na osnovu određivanja koncentracije leka u plazmi i drugih farmakokinetičkih parametara. Odgovarajući animalni modeli takođe mogu biti veoma značajni za predviđanje farmakokinetičkog profila strukturnih varijacija leka. Kada postoji izmene u strukturi leka ili tehnološkoj proceduri neophodno ih je ispitati kroz studije bioekvivalencije. Poseban izazov još uvek je predviđanje resorpcije leka kod ljudi na osnovu podataka dobijenih ispitivanjima na životinjama (Cao i sar., 2006).

Zbog toga je cilj ovoga rada bio da se uspostavi korelacija farmakokinetičkih paramatera između humanog modela i modela kunića za formulaciju sa kontrolisanim oslobađanjem karbamazepina kao i *in vitro in vivo* korelacija (IVIVC) zasnovana na predviđenoj frakciji resorbovanog leka.

Materijal i metode rada / Material and methods

Formulacije leka

Tablete sa dvoslojnim matriksom (proizvod A, Galenika a.d.) pripremljene su postupkom vlažne granulacije. Granule za sloj sa kontrolisanim oslobađanjem dobijene su kvašenjem smeše karbamazepina, mikrokristalne celuloze, skroba i hidroksi-propil-metil celuloze sa povidonom. Osušene granule mešane su sa talkom i magnezijum-stearatom. Sloj sa brzim rastvaranjem pripremljen je i osušen na sličan način. Sloj sa kontrolisanim oslobađanjem kompresovan je u tabletu i prekriven brzo rastvorljivim slojem.

Tegretol® CR tablete (Novartis, Švajcarska, nabavljene u lokalnoj prodaji), odabrane su kao referentni lek (proizvod B) za ovu studiju.

Standard karbamazepina je nabavljen od firme Mikromol GmbH (Nemačka), dok su acetonitril i metanol (HPLC stepena čistoće) nabavljeni od MERCK (Darmstadt, Nemačka).

Model kunića / Rabbit model

U ovoj studiji korišćeno je šesnaest albino kunića, starosti 8 meseci i težine 3,5-4,2 kg. Eksperiment je dizajniran tako da je svaka životinja dobijala pojedinačnu oralnu dozu oba proizvoda karbamazepina sa kontrolisanim otpuštanjem sa 400 mg aktivne supstance. Proizvodi A i B davani su u intervalu od 21 dana. Uzorci krvi uzimani su iz ušne vene u sledećim intervalima: pre davanja leka i pola sata 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h nakon davanja leka. Osam sati nakon davanja leka životinje su vraćane u kaveze i dobijale su vodu i hranu ad libitum. Životinje su hranjene standardnom briketiranim hranom (Veterinarski zavod, Subotica, Srbija). Životinje su negovane prema principima objavljenim u Vodicu za negu i korišćenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication, 1996).

Volonteri / Volunteers

Ova studija urađena je na 24 zdrava ispitanika oba pola (12 žena i 12 muškaraca), starosti 20-52 godine, težine 50-96 kg. Studija je odobrena od strane Nezavisnog etičkog komiteta (Medicinski fakultet, Novi Sad, Srbija), a saglasnost za učešće u studiji potvrdili su potpisom svi ispitanici. Svaki ispitanik dobijao je pojedinačnu oralnu dozu oba proizvoda sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance (proizvod A i B). Proizvodi su testirani u intervalu od 21 dana, tako što su ispitanici uzimali lek na prazan želudac sa 150 ml česmenske vode. Nakon 4 i 7

sati od uzimanja leka ispitanici su dobijali uobičajeni obrok. Krv za analizu uzmala je pre davanja leka i pola sata, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 48, 72, 120 i 144 h nakon davanja leka.

HPLC metoda za određivanje karbamazepina u plazmi kunića i u uzorcima humane plazme

Koncentracije KBZ u plazmi kunića određivane su selektivnom i senzitivnom HPLC metodom na hromatografskom sistemu Hewlett-Packard 1100 (Simić i sar., 2010).

Koncentracije KBZ u uzorcima humane plazme određivane su pomoću HPLC aparata (Hewlett Packard, tip 1090M) sa UV detekcijom (245 nm) (Veng-Pederson i sar., 2000). Separacija pika KBZ od drugih pikova postignuta je korišćenjem kolone Agilent ODS 2 C18 (100x2,1 mm, 5 µm) sa pred kolonom (20x2,1 mm) ispunjenom sa Hypersil ODS2, 5 µm. Mobilna faza je filtrirana kroz 0,45 µm filter. KBZ je iz uzorka plazme ekstrahovan na sledeći način: 1 ml natrijum-fosfatnog pufera (0,3 mol/l, pH 4,3) i 5 ml hloroform sa 50 µg cihaptamida (interni standard) dodato je u 1 ml plazme u 15 ml staklene konusne epruvete i mešano na vorteksu 1 minut. Uzorci su potom centrifugirani na 3000 rpm tokom 10 minuta. Hloroformski sloj je prebačen u staklene epruvete i potom mu je dodato 1 ml fosfatnog pufera (0,2 mol/l, pH 11). Nakon mešanja i centrifugiranja na 3000 rpm tokom 10 minuta vodena faza je odbačena, a hloroformski sloj je uparen u struji azota na 50°C. Ostatak je rastvoren u 50 µl metanola i 10 µl rastvora je injektovano u aparat. Dobijeni rezultati pokazali su da je određivanje osetljivo do 0,2 µg/ml. Linearnost metode je potvrđena u opsegu 0,2-15 µg/ml sa koeficijentom korelacije 0,992. Limit detekcije i limit kvantifikacije iznosili su 0,1 i 0,2 µg/ml. Nađene vrednosti u odnosu na stvarno dodate (recovery) količine KBZ bile su u opsegu 91,8 do 97,4%, pri čemu nije bilo preklapanja pika KBZ sa drugim pikovima iz plazme.

Farmakokinetička i statistička analiza / Pharmacokinetic and statistical analysis

Za farmakokinetička izračunavanja korišćena je nekompartimentalna analiza. Maksimalne koncentracije KBZ u plazmi (C_{max}) i koncentracije KBZ u ispitivanim vremenima kao i t_{max} direktno su očitavani za svaki pojedinačni uzorak. Izračunavani su: vreme eliminacije (λ_z), vreme poluživota ($t_{1/2}$), površina ispod krive koncentracija-vreme korišćenjem pravila trapezoida ($AUC^{0 \rightarrow t}$, i $AUC^{0 \rightarrow \infty}$), oralni klirens (CL/F), prividni volumen distribucije izračunat iz terminalne faze (V_z/F) i maksimalno vreme zadržavanja (MRT).

Svi farmakokinetički parametri računati su za svaku pojedinačnu životinju i svakog pojedinog ispitanika, a rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm st.devijacija.

Neparamaterijski Wilcoxon-ov test korišćen je za izračunavanje razlika u t_{max} . Razlike između glavnih farmakokinetičkih parametara računate su korišćenjem Studentovog t-testa, pri čemu su značajnosti $p < 0,05$ uzimane u obzir.

Uspostavljanje korelacije između predviđene frakcije resorbovanog karbamazepina na osnovu in vitro testa: kunić vs. humani model / Establishing correlation between projected fraction of resorbed carbamazepine based on in vitro test: rabbit vs. human model

U skladu sa rezultatima ispitivanja brzine rastvaranja leka primenjena je *in vitro in vivo* korelacija nivoa A (Homšek i sar., 2008). Uspostavljena je korelacija između *in vivo* rezultata koji predstavljaju frakciju resorbovanog leka kod kunića i čoveka. Odgovarajući *in vivo* profili su interpolirani sa ciljem da se dostignu ekvidistantni vremenski intervali. Prilikom uspostavljanja korelacije, zbog razlike u brzinama oslobađanja lekovite supstance kod kunića i čoveka, u obzir je uzet i vremenski faktor srazmere (Veng-Pedersen i sar., 2009). Predviđene frakcije resorbovanog karbamazepina kod kunića predstavljaju nezavisno promenljivu, dok predviđene frakcije resorbovanog leka kod čoveka predstavljaju zavisno promenljivu. Profili resorpcije leka poređeni su primenom linearne regresione analize u okviru koje su izračunati i statistički parametri – nagib dobijene prave i koeficijent korelacije koji je merilo stepena (nivoa) korelacije.

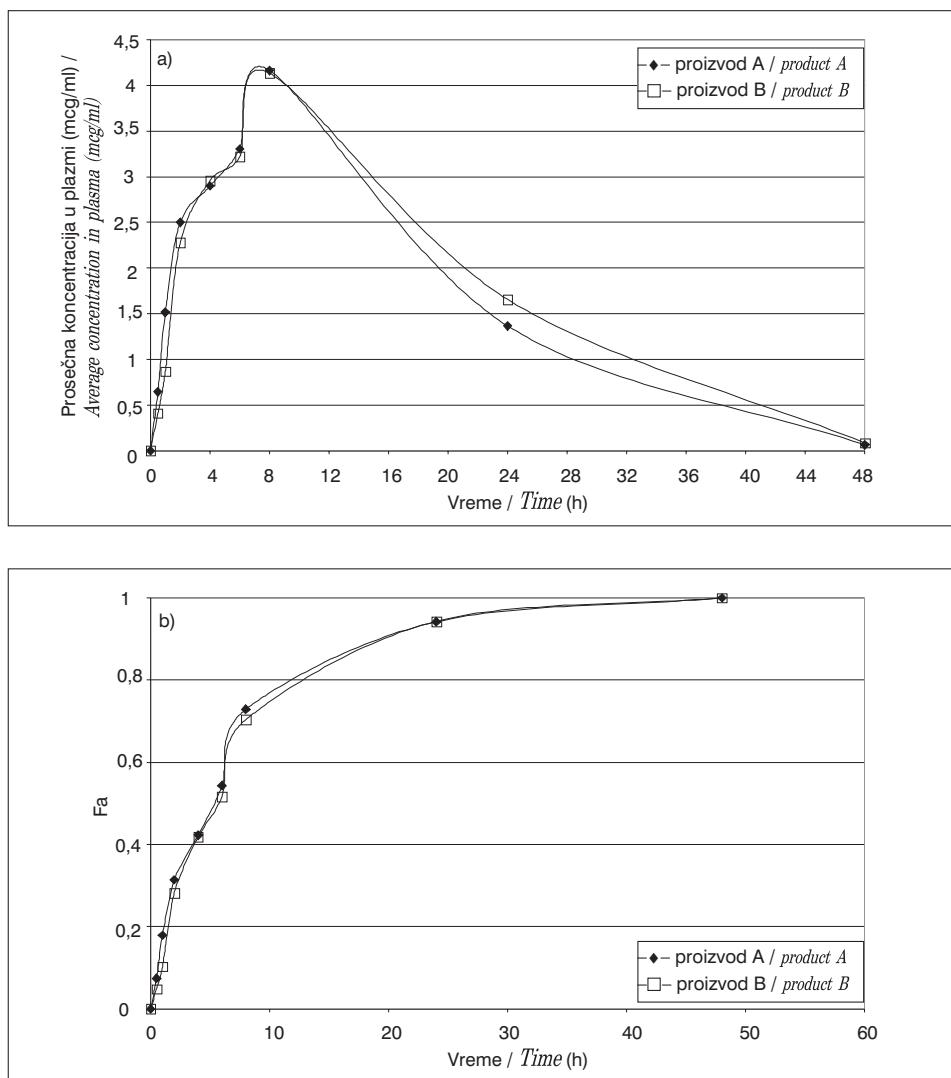
Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Prosečne vrednosti za koncentracije karbamazepina u zavisnosti od vremena nakon pojedinačnog oralnog uzimanja proizvoda A i proizvoda B kod kunića i ljudi prikazane su na slikama 1a i 2a, dok je na slikama 1 b i 2b prikazana predviđena frakcija leka resorbovanog *in vivo* iz testiranih tableta karbamazepina.

Farmakokinetički parametri za KBZ nakon oralne administarcije oba proizvoda KBZ sa kontrolisanim oslobađanjem prikazani su u tabeli 1. Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u bilo kojem farmakokinetičkom parametru između formulacija, ni kod kunića niti kod ljudi.

Nakon minimalnih izmena u formulaciji leka, poređenje njegovih resorpcionih karakteristika je veoma važno. Prosečne vrednosti za C_{max} proizvod A (Galenika a.d.) i za proizvod B (referentni lek-Tegretol) kod kunića bile su 4,77 i 4,42 µg/ml, pri čemu nisu opažene značajne razlike. Bitne razlike nisu uočene ni u vrednostima C_{max} za prizvod A između dve ispitivane vrste. Evidentirana je samo veoma mala razlika u t_{max} između vrsta, dok je prosečna C_{max} kod kunića dostigнутa 11 h, a kod ljudi 14 h nakon uzimanja leka. Brža resorpcija leka nakon uzimanja oba proizvoda kod kunića je u saglasnosti sa ispitivanjima drugih autora koji su pokazali da se KBZ brže resorbuje iz duodenuma i kolona kod kunića, te se tako može objasniti produžena resorpcija proizvoda kod ljudi (Riad i Sawchuk, 1991). Vrednosti za AUC su podešene prema telesnoj masi i takođe nisu primetene bitne razlike ni kod kunića ni ljudi. Nisu nađene statistički značajne razlike za $AUC^{0 \rightarrow t}$, i $AUC^{0 \rightarrow \infty}$ između ispitivanih vrsta. U radovima drugih autora nailazimo na slične farmakokinetičke podatke o eliminaciji proizvoda kod kunića (Rukhadze i sar., 2000). Razlike u vremenu eliminacije leka kod kunića i ljudi (tabela 1) očekivane su zbog razlike u anatomskoj strukturi i funkciji između vrsta.

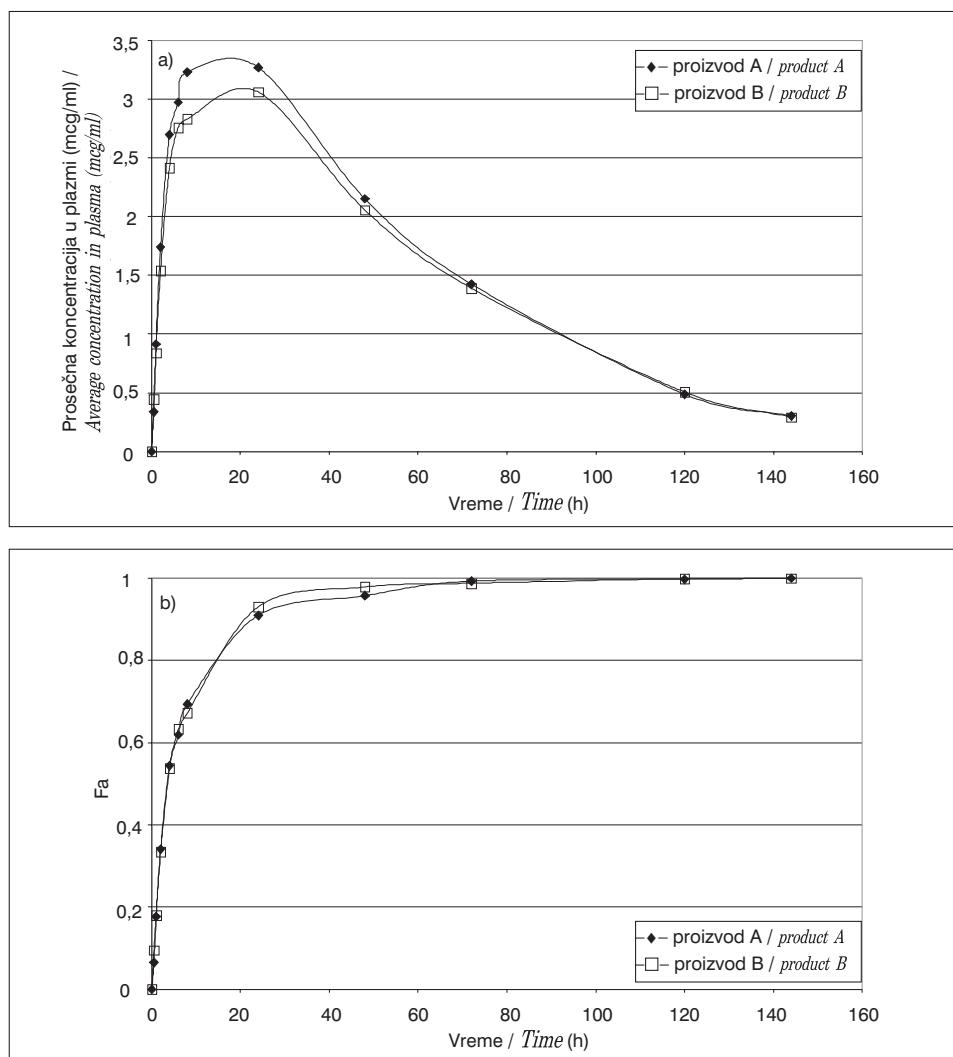
Primer najbolje IVIV korelacije predstavljen je na slici 3. Za proizvod A i B najveći stepen korelacijske sa korelacionim koeficijentom od 0,986 i 0,990, nagnjom i regresionom pravom 1,039 i 1,093, dobijen je preko odnosa resorpcije leka kod ljudi sledeći *in vivo* resorpciju kod kunića na istoj skali. Relativno visok koefi-



Slika 1. (a) Prosečne vrednosti koncentracije karbamazepina u plazmi kunića nakon pojedinačne oralne administracije; (b) Predviđena frakcija resorbovanog leka oba *in vivo* testirana proizvoda /

Figure 1. (a) Average values for carbamazepine concentration in rabbit plasma following individual oral administration; (b) Projected fraction of resorbed medicine for both *in vivo* tested products

cijent korelacije (0,986) za zbirne podatke ukazuje na visoku korelaciju između podataka dobijenih ispitivanjima na ljudima sa podacima koji su dobijeni ispitivanjima na životinjima.



Slika 2. (a) Prosečne koncentracije karbamazepina u plazmi ispitanih nakon uzimanja pojedinačne oralne doze (b) Predviđena frakcija resorbovanog leka ova *in vivo* tesirana proizvoda

Figure 2. (a) Average plasma carbamazepine concentration in human plasma following individual oral administration (b) Projected fraction of resorbed medicine for both *in vivo* tested products

Tabela 1. Farmakokinetički parametri (srednja vrednost \pm st. devijacija) za karbamazepin (KBZ) kod kunića i ispitanika nakon uzimanja oba proizvoda sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance /

Table 1. Pharmacokinetic parameters (mean value \pm st. deviation) for carbamazepine (CBZ) in rabbits and human subjects following intake of both products with controlled-release active substance

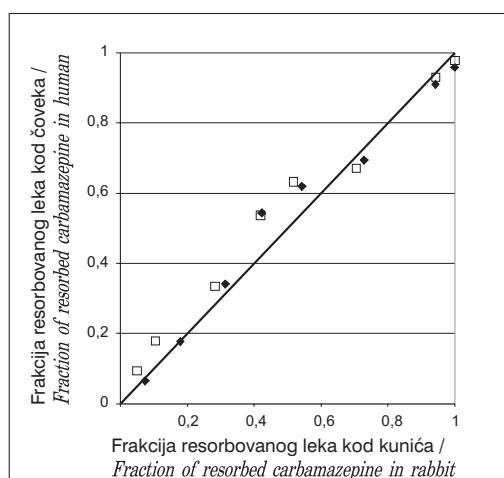
| Proizvod / Product | Uzorci plazme kunića / Samples of rabbit plasma | | Uzorci humane plazme / Samples of human plasma | |
|-----------------------------------|--|---------------------|---|-------------------|
| | A | B | A | B |
| C _{max} [μg/ml] | 4.77 \pm 1.50 | 4.42 \pm 1.08 | 3.88 \pm 0.90 | 3.65 \pm 1.42 |
| t _{max} [h] | 11.5 \pm 2.39 | 11 \pm 2.87 | 14.7 \pm 2.19 | 14.3 \pm 4.28 |
| λ _Z [h ⁻¹] | 0.1491 \pm 0.0405* | 0.1551 \pm 0.0681 | 0.020 \pm 0.005 | 0.018 \pm 0.006 |
| t _{1/2} [h] | 4.88 \pm 1.18* | 4.97 \pm 1.52 | 37.42 \pm 6.73 | 42.01 \pm 10.41 |
| AUC ^{0→t} [μg·h/mlkg] | 20.85 \pm 4.13 | 21.51 \pm 3.88 | 3.48 \pm 1.13 | 3.40 \pm 1.70 |
| AUC ^{0→∞} [μg·h/mlkg] | 21.12 \pm 4.33 | 23.64 \pm 4.99 | 3.48 \pm 1.13 | 3.40 \pm 1.70 |
| CL/F [L/h] | 6.69 \pm 1.25* | 6.47 \pm 1.95 | 1.68 \pm 0.27 | 1.89 \pm 0.71 |
| V _Z /F [L] | 41.41 \pm 11.71 | 50.17 \pm 7.08 | 86.81 \pm 14.68 | 95.32 \pm 23.42 |
| MRT [h] | 12.84 \pm 3.96* | 13.38 \pm 2.54 | 57.48 \pm 10.94 | 57.87 \pm 11.95 |

C_{max} – maksimalna koncentracija u plazmi; t_{max} – vreme potrebno za postizanje C_{max}; λ_Z – terminalna konstanta eliminacije; t_{1/2} – vreme poluživota bazirano na λ_Z; AUC^{0→∞}, AUC^{0→t} – površina ispod krive koncentracije-vreme; CL/F – oralni klirens; V_Z/F – prividni volumen distribucije; MRT – maksimalno vreme zadržavanja /

C_{max} – maximum concentration in plasma; t_{max} – time necessary for reaching C_{max}; λ_Z – terminal constant of elimination; t_{1/2} – time of half-life based on λ_Z; AUC^{0→∞}, AUC^{0→t} – area under curve concentration-time; CL/F – oral clearance; V_Z/F – seeming volume of distribution; MRT – maximum retention time

* Statistička značajnost (p<005) između uzorka plazme kunića i uzorka humane plazme /

*Statistical significance (p<005) between plasma samples from rabbits and from humans



Slika 3. Korelacija između predviđene frakcije resorbovanog karbamazepina kod ljudi i kunića za:

■ – proizvod A, □ – proizvod B /
Figure 3. Correlation between projected fraction of resorbed carbamazepine in humans and rabbits:
■ – product A, □ – product B

Zaključak / Conclusion

U ovoj studiji ispitivana je korelacija vrednosti resorbovane frakcije KBZ kod kunića i ljudi, u cilju predviđanja resorpcionih karakteristika tableta sa kontrolisanim oslobađanjem, formulisanim u Galenici a.d., baziranim na podacima dobijenim na životinjskom modelu. U skladu sa dobijenim vrednostima, moguće je zaključiti da kunić može biti model za praćenje faramakokinetike KBZ u tabletama sa kontrolisanim oslobađanjem. Ovo je veoma važno kad imamo veoma male izmene u formulaciji proizvoda koji je već na tržištu i kad treba posetiti farmakokinetičke karakteristike i bioekvivalenciju prema referentnom proizvodu. Stoga su u ovoj studiji korišćeni podaci i za kuniće i za ljude i poređenjem dobijeni faramakokinetički parametri. Pored ovoga, u kombinaciji sa podacima dobijenim *in vitro* test disolucije, ispitana je *in vitro in vivo* korelacija na dva nivoa. Rezultati ove studije potvrđuju korelaciju predviđene frakcije resorbovanog KBZ iz oba ispitivana proizvoda sa kontrolisanim oslobađanjem između humanog modela i modela kunića.

ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENT:

Ova studija je izvedana kao deo projekta br. TR23015 koji je sufinansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /

This study was performed as a part of project No. TR23015 which is co-financed on behalf of the Ministry for Science and Technology of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Bialer M, Arcavi L, Sussan S, Volosov A, Yacobi A, Moros D, Levitt B, Laor A. Existing and new criteria for bioequivalence evaluation of new controlled release products of carbamazepine, Epilepsy Res 1998; 32: 371-8.
2. Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller A, Landowski CP, Shin HC, Iennernas H, Zhong Y, Amidon GL, Yu LX, Sun D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability human using rat model, Pharm Res 2006; 23(8):1675-86.
3. European Commission Guideline on dossier requirements for type IA and type IB notifications, 2003.
4. Guidance for industry: Validation of analytical procedures, methodology, CDER/FDA 1999.
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, revised 1996.
6. Homšek I, Parožić J, Mitić M, Simić S, Cvetković N, Đurić Z. Development of a drug release methodology for carbamazepine CR tablets based on bioequivalence evaluation, J Drug Del Sci Tech 2008; 18(2): 139-44.
7. Malinowski HJ, Marroum PJ. FDA requirements for controlled release products-In: Encyclopedia of controlled drug delivery, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999. vol. I, 381-94.
8. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 36th edition. Reynolds JEF Ed. The Pharmaceutical Press. London, 2009, 353-8.

9. McNamara JO. 1996, Drugs Effective in the Therapy of the Epilepsies In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., New York, McGraw-Hill, Inc, 1996: 473-5.
10. Note for guidance on: Validation of analytical procedures, methodology, CPMP/ICH/281/95).
11. Riad LE, Sawchuk RJ. Absorptive clearance of carbamazepine and Selected Metabolites in Rabbit Intestine Pharm Res,1991; 8: 1050-5.
12. Rukhadze MD, Alexishvili MM, Okujava NV, Sebisveradze MV, Okujava VM, Tsagareli SK. Interaction of carbamazepine and phenobarbital in rabbits. Biomed Chromatogr 2000; 14: 344-8.
13. Simić S, Ristić S, Popadić D, Homšek I. The selective and sensitive HPLC method for determination of carbamazepine and carbamazepine epoxide in rabbit plasma, 7th Word meeting on Pharamceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Tehnology, Valeta, Malta, mart 2010; 8-11.
14. Stevens RE, Limsakun T, Evans G. Controlled, multidose, pharmacokinetic evaluation of two extended-release carbamazepine formulations (Carbatrol and Tegretol-XR), J Pharm Sci 1998; 87: 1531-4.
15. The Tegretol OROS Osmotic Release Delivery System Study Group, Double-blind crossover comparison of Tegretol-XR and Tegretol in patients with epilepsy, Neurology, 1995; 45: 1703-7.
16. Veng-Pedersen P, Gobburu JVS, Meyer MC, Straughn AB. Carbamazepine level-A in vitro-in vivo correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach. Biopharm Drug Dispos 2000; 21: 1-6.
17. Wilding IR, Davis SS, Hardy JG, Robertson CS, John VA, Powell ML, Leal M, Lloyd P, Walker SM. Relationship between systemic drug absorption and gastrointestinal transit after the simultaneous oral administration of carbamazepine as a controlled-release system and as a suspension of N-labeled drug to healthy volunteers, Br J Clin Pharm 1991; 32: 573-9.

ENGLISH

PREDICTING ABSORPTION AND PHARMACOKINETIC PROFILE OF CARBAMAZEPINE FROM CONTROLLED-RELEASE TABLET FORMULATION IN HUMANS USING RABBIT MODEL

Irena Homšek, Dragica Popadić, Slobodanka Simić, Slavica Ristić,
Katarina Vučićević, Branislava Miljković

Controlled-release (CR) pharmaceutical formulations offer several advantages over the conventional, immediate release dosage forms of the same drug, including reduced dosing frequency, decreased incidence and/or intensity of adverse effects, greater selectivity of pharmacological activity, reduced drug plasma fluctuation, and better compliance. After a drug product has been registered, and is already on market, minor changes in formulation might be needed. At the same time, the product has to remain effective and safe for patients that could be confirmed via plasma drug concentrations and pharmacokinetic characteristics. It is challenging to predict human absorption and pharmacokinetic characteristics of a drug based on the *in vitro* dissolution test and the animal

pharmacokinetic data. Therefore, the objective of this study was to establish correlation of the pharmacokinetic parameters of carbamazepine (CBZ) CR tablet formulation between the rabbit and the human model, and to establish *in vitro* *in vivo* correlation (IVIVC) based on the predicted fractions of absorbed CBZ. Although differences in mean plasma concentration profiles were notified, the data concerning the predicted fraction of drug absorbed were almost superimposable. Accordingly, it can be concluded that rabbits may be representative as an *in vivo* model for predicting the pharmacokinetics of the CR formulation of CBZ in humans.

Key words: carbamazepine, controlled-release formulation, human, *in vitro* *in vivo* correlation, pharmacokinetics, rabbit

РУССКИЙ

ПРЕДВИДЕНИЕ РЕЗОРБЦИИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КАРБАМЕЗАПИНА ИЗ ТАБЛЕТОК С КОНТРОЛИРОВАННЫМ ОСВОБОЖДЕНИЕМ У ЛЮДЕЙ ПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИ КРОЛИКОВ

Ирина Хомшек, Драгица Попадич, Слободанка Симић, Славица Ристич,
Катарина Вучичевич, Бранислава Милькович

Фармацевтические формулировки с контролированным освобождением имеют несколько преимуществ в отношении конвенциональных дозированных форм с мгновенным освобождением той же лекарственной субстанции, что прежде всего отражается в редуцированной частоте дозирования, уменьшенном явлении и/или интенсивности нежелательных эффектов, большей фармакологической селективности, редуцированной флуктуации лекарственной субстанции в плазме и лучшей терпимости. Когда после законченной регистрации препарат найдётся на рынке может явиться нужда для меньших изменений в формулировке. В такое же время он нужен остат эффективный и безопасный для пациентов, что может быть подтверждение на основе концентрации лекарственной субстанции в плазме и фармакологических данных. Отдельный вызов представляет собой предвидение резорбции фармакокинетических свойств лекарственной субстанции у людей на основе определения *in vitro* скорости растворения и фармакокинетических данных, полученных испытанием на животной модели. Вследствие этого цель этой работы была установить корреляцию фармакокинетических параметров среди моделей кроликов и гуманной модели для формулировки таблеток с контролированным освобождением карbamazepina (КБЗ) словно и *in vitro* и *in vivo* корреляция обоснована на предвиденной фракции впитыванного лекарства. И возле замеченных разниц в средних профилях плазма концентраций, результаты относящиеся на предвиденную фракцию впитыванной лекарственной субстанции были почти идентичны. На основе того можно сделать вывод, что кролик может пользоваться как репрезентативная *in vivo* модель для предвидения фармакокинетических характеристик формулировки с контролированным освобождением КБЗ у людей.

Ключевые слова: карbamазепин, формулировки с контролированным освобождением, люди, *in vitro*, *in vivo*, корреляция, фармакокинетика, кролики

STANDARDNE RADNE PROCEDURE U PROIZVODNJI SREMSKE TRADICIONALNO FERMENTISANE KOBASICE*

*STANDARD WORKING PROCEDURES IN PRODUCTION OF
TRADITIONALLY FERMENTED SREMSKA SAUSAGE*

Slavica Vesović Moračanin, L. Turubatović, M. Rašeta, S. Stefanović,
S. Janković, Marija Škrinjar**

Ispitivanja sprovedena u okviru Projekta "Tehnološke i protektivne osobine autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tradicionalnih fermentisanih kobasicama i mogućnosti njihove primene u industriji mesa" (Evidencijski broj: 20127), finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, dala su odgovor o karakteristikama kvaliteta ulaznih sirovina namenjenih za proizvodnju sremske kobasice – jedne od naših najpoznatijih tradicionalno fermentisanih kobasicama (izbor mesa, masnog tkiva, dodataka i začina). Registrirani su podaci vezani za postupke njihove obrade, utvrđeni su mikroklimatski uslovi (temperatura, relativna vlažnost i cirkulacija vazduha) tokom čitavog procesa proizvodnje i fermentacije, kao i prisustvo i vrsta mikroorganizama, prvenstveno bakterija mlečne kiseline (BMK) nosioca mlečne fermentacije. Utvrđena su najvažnija svojstva nadeva, režimi dimljenja, fermentacije, zrenja, sušenja, kao i parametri kvaliteta i bezbednosti gotovog proizvoda.

Istovremeno, određene su standardne radne procedure (SRP) za pripremu mesa, masnog tkiva, formiranje i punjenje nadeva u omotače, kao i karakteristike gotovih proizvoda. Navedene SRP-e treba da posluže kao vodič industriji mesa u procesu proizvodnje ove tradicionalne fermentisane kobasice.

Ključne reči: sremska kobasica, tradicionalne fermentisane kobasicice, prizvodni parametri, standardne radne procedure

* Rad primljen za štampu 10. 02. 2011. godine

** Dr Slavica Vesović Moračanin, specijalista higijene namirnica, naučni saradnik, dr Lazar Turubatović, naučni savetnik, Mladen Rašeta, istraživač saradnik, Srdan Stefanović, istraživač saradnik, Saša Janković, istraživač saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd; dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad

Uvod / Introduction

Proizvodnja fermentisanih kobasic je oblast prerade mesa koja je, poslednjih nekoliko decenija, bila predmet intenzivnih stručnih i naučnih istraživanja. Do sada su izučeni najvažniji principi proizvodnje, definisani su uzroci nekih od najčešćih grešaka, utvrđeni su određeni parametri kvaliteta, ali je ostalo još mnogo toga da se ispita i proveri u složenim postupcima pretvaranja sirovina u gotove proizvode pikantno-aromatičnih svojstava, kakvi su tradicionalno fermentisane kobasice (Kozačinski i sar., 2008).

Sremska kobasica je tipičan predstavnik fermentisanih kobasic. Međutim, zbog određenih karakteristika to je i specifičan proizvod u kome se zrenje (fermentacija) odvija pod posebnim uslovima, pa se zbog toga umnogome razlikuje od drugih trajnih kobasic (Vesković Moračanin, 2007). Dugogodišnja proizvodnja i pojava kvalitetnih proizvoda doprineli su da se ove kobasice pročuju po svojim svojstvima i da postanu naročito tražene. Na izvestan način afirmisale su se kao specifičan nacionalni proizvod. To su bili glavni razlozi da se pokuša sa znatnim povećanjem proizvodnje, prvo u zanatskim uslovima domaćinstva, a danas i u savremenim pogonima industrije mesa (Tadić, 2000). Ali, industrijalizacija proizvodnje i naglo povećanje broja proizvođača, sa neizbežnim rizikom dobijanja proizvoda veoma različitog kvaliteta, predstavljala je opasnost da se bitno izmene izvorna svojstva ovoga tradicionalnog proizvoda.

Najčešći navodi korišćeni u opisu sremske kobasice su: "dugogodišnja proizvodnja", "kvalitetan trajni proizvod", "specifičan nacionalni proizvod", "standardnost kvaliteta". Međutim, oni sami po sebi nisu dovoljni da se ovaj proizvod održi na tržištu bez pisanih podataka o tehnologiji proizvodnje, osobinama i parametrima kvaliteta. Dosadašnje iskustvo govori da je takvih zapisa veoma malo pa se i način tradicionalne izrade još uvek prenosi usmeno, sa kolena na koleno.

U domaćinstvima sremska kobasica se proizvodi, obično, u periodu prelaza kasne jeseni u zimu kada je temperatura vazduha po pravilu niska, oko 0°C i niže (Rašeta, 1957), pretežno od svinjskog mesa, slanine (čvrstog masnog tkiva), uz dodatak soli i začina. Tom prilikom, meso i slanina se, u većini slučajeva, posebno ne pripremaju niti odabiraju, jer se kobasice, najčešće, prave onog dana kada je svinja i zeklana. Nakon usitnjavanja mesa, mesnih obresaka i komada masnog tkiva dodaje se kuhinjska so, začini i uglavnom, male količine tečne faze (bujon, hladna voda). Dobijeni nadev se, najčešće, puni ručnom punilicom u tanka svinjska creva koja se formiraju u parove uobičajene dužine. Kobasice se kače na drvene štapove, cede, a zatim se prenose u pušnicu gde se dime tzv. hladnim postupkom tokom 6-7 dana, a ne retko i duže. Posle završenog dimljenja kobasice se drže na suvom, prozračnom mestu radi sušenja, koje obično traje oko 2 nedelje (u seoskim domaćinstvima to su najčešće same pušnice, tavanski prostori ili slično) (Tojagić, 1996). U toku ovog perioda počinje paralelno intenzivna faza zrenja i sušenja, pri čemu ponekad gube veoma velike količine vode. U

navedenim uslovima, zrenje je završeno otprilike krajem treće nedelje, kada sremska kobasica dobija karakteristična senzorska i fizičko-hemijska svojstva gotovog proizvoda (Vesović, 2009).

Ispitivanja sprovedena u okviru Projekta "Tehnološke i protektivne osobine autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tradicionalnih fermentisanih kobasicu i mogućnosti njihove primene u industriji mesa", definisala su proizvodne parametre i tehnološke postupke izrade sremske kobasice koja je proizvedena na tradicionalan način, veoma blizak onome koji se nekada primenjivao u domaćinstvima. Međutim, da bi se postigla što veća standardnost u industrijskoj proizvodnji sremske kobasice, neophodno je korišćenje osnovnih sirovina, dodataka i začina, koji ispunjavaju određene zahteve.

Sirovine za proizvodnju sremske kobasice / Raw materials for production of Sremska sausage

Sremska kobasica je proizvedena u industrijskim uslovima, primenom osnovnih načela tradicionalne proizvodnje, a u skladu sa važećim "Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa" (Sl. list SCG br. 33/2004). Sastav osnovne sirovine kobasice činilo je smrznuto svinjsko meso plećke (-5°C), ohlađeno meso buta (4°C) i smrznuto čvrsto masno tkivo (-5°C). Kao dodaci korišćeni su nitritna so i dekstroza, a od prirodnih začina upotrebljeni su usitnjeni beli luk i mlevene slatka i ljuta paprika. Nadev je punjen u (svinjska) tanka creva.

Mikrobiološke karakteristike sirovina / Microbiological characteristics of raw materials

Mikrobiološki kriterijumi osnovnih sirovina (svinjsko meso I i II kategorije, čvrsto masno tkivo) dati su u tabeli 1.

Patogeni mikroorganizmi (*Salmonella spp.*, *L.monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* i sulfitoredukuće klostridije) ne smeju biti prisutni, dok ukupan broj bakterija ne sme biti veći od 10^5 cfu/g, odnosno 10^3 cfu/g, za svinjsko meso I i II kategorije i čvrsto masno tkivo, respektativno. Enterokoke i bakterije familije *Enterobacteriaceae* imaju, približno, iste kriterijume (ne više od 5×10^2 cfu/g), uz nešto strože zahteve za svinjsko meso I kategorije, kada su u pitanju enterokoke (10^2 cfu/g). Broj kvasaca i plesni u svinjskom mesu ne sme biti veći od 10^2 , a u čvrstom masnom tkivu do jednog eksponenta više.

Broj bakterija mlečne kiseline i broj mikrokoka trebalo bi da je veći ili približan vrednostima od 2,3 (log cfu/g), respektativno. Neki od ovih parametara ispitivanja nisu predviđeni važećim Pravilnikom o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu (Sl.list SRJ br.26/93), ali sprovedena istraživanja za potrebe ovog projekta nameću potrebu za njihovim ispitivanjem sa predloženim granicama.

Tabela br.1 *Mikrobiološki kriterijumi osnovnih sirovina u proizvodnji sremske kobasice /*
 Table 1. *Microbiological criteria for basic raw materials in production of Sremska sausage*

| Vrsta ispitivanja / Type of investigation | Svinjsko meso I kat. (Svinjski but) Pork cat. I (Sirloin) | Svinjsko meso II kat. (Svinjska plećka) / Pork cat. I (Sirloin) | Čvrsto masno tkivo / Solid fatty tissue |
|--|---|---|--|
| <i>Ukupan broj bakterija /</i> <i>Total number of bacteria</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≤ 5.00 | ≤ 5.00 | ≤ 3.00 |
| <i>Enterobacteriaceae spp</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≤ 2.50 | ≤ 2.50 | ≤ 2.50 |
| <i>Enterococcaceae spp</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≤ 2.00 | ≤ 2.50 | ≤ 2.20 |
| <i>Kvasci i plesni /</i> <i>Yests and fungi</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≤ 2.00 | ≤ 2.00 | ≤ 2.90 |
| <i>Bakterije mlečne kiseline /</i> <i>Lactic acid bacteria</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≥ 2.30 | ≥ 2.30 | – |
| <i>Micrococcaceae spp</i> <i>(log₁₀ cfu/g)</i> | ≈ 2.50 | ≈ 2.30 | – |
| <i>E.coli</i> <i>u 1g</i> | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted |
| <i>Staphylococcus aureus</i> <i>u 1g</i> | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted |
| <i>Sulfitoredukujuće klostridije /</i> <i>Sulphite-reducing clostridia</i> <i>u 1g</i> | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted |
| <i>L.monocytogenes</i> <i>u 25g</i> | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted |
| <i>Salmonella spp.</i> <i>u 25g</i> | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted | nije dozvoljeno / not permitted |

Parametri kvaliteta sirovina / Parameters of raw material quality

U izvornim uslovima proizvodnje sremske kobasice u domaćinstvima, uslov za nastanak kvalitetnog proizvoda bio je da meso potiče od starijih svinja rase mangulica. I u industrijskim uslovima, prednost se daje mesu nešto starijih životinja, koje sadrži više suve materije i ima intenzivniju boju i čvršću teksturu. Upotreba mesa zrelijih životinja sa više mišićnih pigmenata jedan je od pre-duslova za postizanje zadovoljavajuće boje (Radetić, 1997).

Meso treba da je dobro ozrelo, sa otvorenom mikrostrukturom, čiji pH ne treba da bude viši od 6,5, dok pH vrednosti za svinjsko meso I kategorije treba da budu oko 6,0; sadržaj vode treba da je ispod 75% (svinjsko meso II kategorije), dok za svinjsko meso I kategorije sadržaj vode treba da je za 2-3 % manji. Sadržaj proteina ne sme biti niži od 20% (za svinjsko meso I kategorije, obavezan kriterij-

jam), a sadržaj masti oko 5% (za svinjsko meso II kategorije) i ispod 5% (za svinjsko meso I kategorije) (Tabela br. 2). To znači, da iz mesa pre usitnjavanja, mora biti odstranjeno međumišićno masno i grubo vezivno tkivo. Kao što je poznato, međumišićno masno tkivo sadrži molekule nezasićenih nižih masnih kiselina, koje prilikom usitnjavanja zamašćuju komade mesa, što dovodi do otežanog formiranja boje i odavanja vlage tokom fermentacije, zrenja i sušenja kobasicica. Grubo vezivno tkivo, tokom sušenja, postaje tvrdo, čime se umanjuje kvalitet proizvoda. Za izradu sremske kobasice koristi se potkožno masno tkivo svinja sa predela vrata (gronik) ili leđa. Međumišićno masno tkivo nije dovoljno kvalitetno za upotrebu u izradi ovog proizvoda. Vrednost pH u masnom tkivu ne treba da bude viša od 6,30, a konzistencija čvrsta sa zrnastom strukturom.

**Tabela 2. Hemijski parametri kvaliteta sirovine za proizvodnju sremske kobasice /
Table 2. Chemical parameters for quality of raw materials for production of Sremska sausage**

| Ispitivani parametri kvaliteta / <i>Examined quality parameters</i> | Svinjsko meso I kat. (Svinjski but) / <i>Pork cat. I (Sirloin)</i> | Svinjsko meso II kat. (Svinjska plećka) / <i>Pork cat. II (Shoulder)</i> | Čvrsto masno tkivo / <i>Solid fatty tissue</i> |
|--|--|--|---|
| Sadržaj vode (%) / <i>Water content (%)</i> | 72,99 \pm 0,14 72,85 \pm 0,14 71,97 \pm 0,13 | 76,61 \pm 0,19 74,80 \pm 0,17 74,08 \pm 0,19 | 15,99 \pm 0,08 13,63 \pm 0,07 17,93 \pm 0,08 |
| Sadržaj masti (%) / <i>Fat content (%)</i> | 4,66 \pm 0,13 4,99 \pm 0,15 4,86 \pm 0,18 | 5,54 \pm 0,10 5,34 \pm 0,14 5,94 \pm 0,19 | 87,00 \pm 0,10 81,60 \pm 0,15 84,84 \pm 0,20 |
| Sadržaj proteina (%) / <i>Protein content (%)</i> | 21,31 \pm 0,13 21,84 \pm 0,16 20,61 \pm 0,18 | 19,36 \pm 0,15 19,75 \pm 0,18 19,56 \pm 0,19 | 2,67 \pm 0,20 4,48 \pm 0,11 5,65 \pm 0,16 |
| Sadržaj pepela (%) / <i>Ash content (%)</i> | 0,99 \pm 0,01 0,96 \pm 0,01 0,95 \pm 0,02 | 1,07 \pm 0,01 1,02 \pm 0,01 0,91 \pm 0,02 | 0,12 \pm 0,01 0,18 \pm 0,01 0,19 \pm 0,02 |
| Sadržaj NaCl (%) / <i>NaCl content (%)</i> | 0,14 \pm 0,01 0,16 \pm 0,01 0,12 \pm 0,01 | 0,12 \pm 0,01 0,19 \pm 0,01 0,15 \pm 0,01 | 0,10 \pm 0,01 0,09 \pm 0,01 0,15 \pm 0,01 |
| a_w vrednost / <i>a_w value</i> | 0,972 \pm 0,001 0,978 \pm 0,001 0,973 \pm 0,001 | 0,973 \pm 0,001 0,981 \pm 0,001 0,973 \pm 0,001 | 0,909 \pm 0,001 0,917 \pm 0,001 0,912 \pm 0,001 |
| pH vrednost / <i>pH value</i> | 6,07 \pm 0,001 6,05 \pm 0,001 6,02 \pm 0,001 | 6,42 \pm 0,001 6,61 \pm 0,001 6,56 \pm 0,001 | 6,28 \pm 0,002 6,24 \pm 0,002 6,30 \pm 0,002 |

Meso se može koristiti u ohlađenom stanju, kada temperatura treba da bude između 0 i 4°C, delimično smrznuto, kada je temperatura oko -10°C i potpuno smrznuto, kada je temperatura ispod -18°C. Ukoliko se koristi ohlađeno meso, zbog potpunijeg odvijanja procesa zrenja, najbolji rezultati se postižu ukoliko se ono upotrebni 48 sati posle klanja životinja. Delimično smrznuto meso može

se koristiti do 30 dana, a potpuno smrznuto do 90 dana. U ovom periodu nisu utvrđene promene u mesu, koje bi mogle uticati na kvalitet tradicionalno fermentisanih kobasicica. Kada je u pitanju masno tkivo, ono se mora delimično smrznuti radi zaustavljanja hidrolitičkih aktivnosti lipaza i obezbeđenja kristalizacije masti, čime masno tkivo postaje pogodno za usitnjavanje.

Karakteristike dodataka i začina / Characteristics of additives and spices

Svojevremeno, u proizvodnji tradicionalno fermentisanih kobasicica u domaćinstvima, korišćena je samo kuhinjska so i prirodni začini (aleva paprika i beli luk). Sada se radi veće sigurnosti i brzeg postizanja poželjne boje koristi nitritna so, tj. mešavina kuhinjske soli i nitrita u odnosu 99,4:0,6%. Nitritna so, kao i dekstroza i prirodni začini, ne smeju da sadrže patogene bakterije. Ukupan broj bakterija kod nitritne soli i dekstroze ne sme da bude veći od 10^3 , a kod prirodnih začina (usitnjenoj belog luka i mlevene slatke i ljute paprike) ne veći od 10^5 . Broj kvasaca i plesni, kod nitritne soli i dekstroze, ne treba da je veći od 10^2 , a kod začina od 10^3 .

U toku skladištenja dodataka i začina veoma je važno da ne dođe do stvaranja grudvica, već da se očuva praškasta, odnosno pastozna struktura (u slučaju usitnjenoj belog luka) radi što boljeg mešanja sa ostalim komponentama nadeva. Kuhinjska so ne sme da sadrži jedinjenja magnezijuma, zbog higroskopnosti, zgrudnjavanja i gorkog ukusa. Ispitivanja su pokazala da u pripremljenoj nitritnoj soli i originalno upakovnoj dekstrozi, u toku 30 dana skladištenja, ne dolazi do promena. Mlevena suva, ljuta i slatka, paprika, pri 18°C može da se čuva 12 meseci, a beli luk u glavicama, pri $+4^\circ\text{C}$, takođe, 12 meseci.

Karakteristike nadeva / Characteristics of filling

Količinski odnosi osnovnih sirovina, dodataka i začina za proizvodnju sremske kobasicice prikazani su u tabeli 3. Kao što se može videti meso učestvuje sa 75%, masno tkivo sa 25%, nitritna so sa 2,6%, dekstroza sa 0,5%, usitnjeni beli luk sa 0,8%, slatka i ljuta mlevena paprika sa po 0,3%, tj. ukupno sa 0,6%. Najbolji rezultati se postižu ako je temperatura nadeva u granicama od 0 do -5°C , što zavisi od toga da li je upotrebljeno ohlađeno, delimično smrznuto ili smrznuto meso. Ako se koristi smrznuto masno tkivo, onda se mora koristiti ohlađeno meso, da bi se obezbedila temperatura nadeva od oko -5°C . Niža temperatura nadeva otežava punjenje u prirodne omotače i može uzrokovati pojavu rupa i pukotina u sadržaju gotovih proizvoda. pH nadeva ne bi trebalo da bude viši od 6,1, a a_w ne veći od 0,96. Meso i masno tkivo treba da su homogeno izmešani, veličina čestica da se kreće u granicama od 5-8 mm (Turubatović i sar., 2004).

Tabela 3. Osnovni sastav sremske kobasice sa osnovnim elementima procesa proizvodnje /

Table 3. Basic composition of Sremska sausage with basic elements of production process

| Dimenzije i težina kobasice / Dimensions and weight of sausage | Omotač / Wrapper | Sastoјci / Contents | Količina / Quantity (100 kg) | Dužina procesa zrenja / Duration of maturing process |
|---|---|--|---|---|
| 34-36 mm ø 24 cm dužina / 24 cm length 300 g težina / 300 g weight (par kobasica) / (one pair of sausages) | prirodan (svinjsko tanko crevo) / natural (pork small intestine) | <ul style="list-style-type: none"> – Ohlađeno svinj.meso buta / – chilled pork, sirloin – Smrznuto svinj.meso plećke / – frozen pork, shoulder – Smrznuto čvrsto masno tkivo / – frozen solid fatty tissue – Nitritna so sa 1% šalitre / – nitrite salt with 1% saltpeper – Šećer (dekstroza) / – sugar (dextrose) – Mlevena ljuta i slatka paprika / – ground hot and sweet paprika – Usitnjeni beli luk / – minced garlic | 40.0 kg 35.0 kg 25.0 kg 2.6 kg 0.5 kg 0.6 kg 0.8 kg | Dimljenje – 3 dana na 20°C / Smoking – 3 days at 20 °C 66% RVV Zrenje – 21 dan na 12 do 29°C / Maturing – 21 days at 12 to 29 °C 58% - 80% RVV |

Pri pripremi nadeva bitan je i redosled komponenti i brzina kretanja noža iz zdele kutera. Kada se koristi delimično smrznutog ili smrznuto meso, ono se najpre usitnjava do veličine čestica oko 10 mm, a zatim se dodaje delimično smrznuto masno tkivo. Kada se koristi ohlađeno meso ili delimično smrznuto ili smrznuto masno tkivo, redosled je obrnut. Kuhinjska so, dekstroza i začini se dodaju u usitnjeno meso i masno tkivo na kraju procesa pripreme nadeva, uz nastavak mešanja naredna 2-3 minuta. Pripremljen nadev se, pre punjenja u tanka creva, usitnjava do veličine čestica oko 3-5 mm, čime se dobija konačni mozaik nadeva sa komadićima ujednačene veličine.

Formirani nadev za sremsku kobasicu puni se pod vakuumom u prirodne omotače – svinska tanka creva, prečnika 34-36 mm. Omotači moraju biti čvrsto napunjeni nadevom da bi se izbegla pojava pukotina ili rupa u sadržaju kobasica. Kobasice se, tokom punjenja, automatski uparuju, pri čemu se obezbeđuje dužina od oko 30 cm (ne manja od 24 cm) i masa od oko 150 g po komadu, odnosno 300 g po jednom paru kobasica.

Karakteristike proizvodnih faza / Characteristics of production stages

Temperiranje nadeva i sušenje površine omotača kobasica, posle punjenja, obavlja se u klima-komori, u trajanju od 4 sata, pri temperaturi od 18°C, relativnoj vlažnosti vazduha od 85% i cirkulaciji vazduha od 0,5 m/sec. Dimljenje sremskih kobasicica, takođe, traje 4 sata, s tim da je vlažnost vazduha 94%, temperatura od 18°C, a cirkulacija od 0,1 m/sec. Fermentacija sremskih kobasicica, u industrijskim uslovima, traje 3 dana, pri temperaturi od 16°C, relativnoj vlažnosti vazduha od 94%, a cirkulacija od 0,1 m/sec.

vazduha od 92 do 90% i cirkulaciji vazduha od 0,5 m/sec. Dalje zrenje i sušenje u trajanju od 18 dana obavlja se pri temperaturi od 14 do 15°C, programiranoj opadajućoj relativnoj vlažnosti vazduha od 90 do 78% i cirkulaciji vazduha od 0,3 do 0,1 m/sec. U industriji se gotove sremske kobasice, neupakovane, najduže skladište do 3 dana, pri čemu se obezbeđuje temperatura od 10°C i relativna vlažnost vazduha od 85%, da bi se smanjilo dalje isušivanje kobasica.

Parametri kvaliteta gotovih proizvoda/ Parameters of quality of finished products

Fizičko-hemijski parametri / Physical-chemical parameters

Da bi se očuvao kvalitet tradicionalne sremske kobasice, obezbedio kontinuitet u njenoj daljoj proizvodnji, neophodno je definisati i tokom proizvodnje zadovoljiti određene kriterijume, počev od kvaliteta osnovnih sirovina, postupka izrade, pa do kvaliteta, samog, gotovog proizvoda. Drugim rečima, neophodno je postaviti minimalne, ali obavezne, tehnološke zahteve radi dobijanja proizvoda poželjnih i ujednačenih fizičko-hemijskih i senzorskih svojstava.

Sremska kobasica, kao fermentisani proizvod od mesa, može na kraju procesa zrenja sadržavati 25-30% vode, mada su utvrđene količine i ispod 20%, pri čemu je proizvod i dalje imao prosečno dobra svojstva. Ovakav, relativno nizak procenat vode uslovljen je uskim promerom creva (28-36 mm) kao i dužinom zrenja koje može trajati 2-3 nedelje i više (Turubatović i Tadić, 2004).

Sa stepenom gubitka vode, povećava se sadržaj natrijum-hlorida, pa je preporučeni sadržaj soli kod gotovog proizvoda ispod 4,5%. Promena a_w vrednosti je u direktnoj korelaciji sa procesom gubitka vlage i treba da je ispod 0,84. Kada je reč o kvarljivosti ovakve a_w vrednosti ukazuju na mikrobiološku stabilnost proizvoda, pa je i njihovo čuvanje na temperaturama ambijenta moguće (Coretti, 1971).

Vrednosti pH nadeva gotovog proizvoda je u funkciji procesa zrenja kobasica i ne treba da bude niža od 5,30. Vrednosti pH rezultat su uticaja većeg broja faktora od kojih, svakako, najveći značaj predstavlja količina i vrsta dodatih šećera, vrsta mišićnog tkiva i sastav nadeva, domaća, epifitna mikroflora i dodate BMK, kao i drugi elementi zrenja sirovih kobasic (Hieri i dr., 1997).

Sa aspekta mikrobioloških kriterijuma, u gotovim Sremskim kobasicama ne sme da bude patogenih bakterija, kvasaca i plesni, a ukupan broj bakterija ne sme biti veći od 10^6 .

Senzorska svojstva gotovih proizvoda / Sensory characteristics of finished products

Gotov proizvod se, najčešće, nalazi u parovima koji imaju pravilno formirane krajeve. Prirodni omotač treba da naleže ravnomerno uz nadev. Nadev, koji se sastoji od ujednačenih usitnjениh komadića mesa crvene boje i komadića čvrstog masnog tkiva bele boje, treba da ima svojstvo narezivanja. Na presecima kobasica ne sme da ima rub sušenja, kao ni šupljina niti pukotina (slika 1). Konzis-

tencija kobasica mora biti čvrsta, ali ne i tvrda. Miris treba da je karakterističan za fermentisane proizvode, sa blagom nijansom na dim.



Slika 1. Sremska kobasica proizvedena na tradicionalan način
Figure 1. Sremska sausage produced in traditional way

ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rezultati rada su deo naučno istraživačkog projekta u oblasti tehnološkog razvoja, evidencijski broj 20217: "Tehnološke i protektivne osobine autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline, izolovanih iz tradicionalno fermentisanih kobasicama i mogućnost njihove primene u industriji mesa" finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /

The results of this research are part of a scientific investigative project in the area of technological development, Project Number 20217: Technological and protective characteristics of autochthonous strains of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented sausages and possibilities for their implementation in the meat industry financed by the Ministry for Science and Technology of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Coretti K. Rohwurststreinfung und Fehlerzeugnisse bei der Rohwurstherstellung. Fleischforschung und Praxis, Schriftenreihe Heft 5, Verlag der Rheinhessischen Druckwerkstate Alzey, 1971.
2. Hierro E, de la Hoz L, Ordóñez JA. Contribution of Microbial and Meat Endogenous Enzymes to the Lipolysis of Dry Fermented Sausages. J Agric Food Chem 1997; 45: 2989-95.
3. Kozacinski L, Drosinos E, Caklovica F, Cocolin L, Gasparik-Reichardt J, Vesovic S. "Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages", Food Technology and Biotechnology 2008; 46(1): 93-106.
4. Radetić P. Sirove kobasicice, Izdavač: Autor, Beograd, 1997.
5. Rašeta J. Ispitivanje procesa zrenja u Sremskoj kobasici, Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Beograd, 1957.
6. Sl. list SRJ br.33/2004 Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa, 2004.

7. Tadić R. Principi proizvodnje, parametri kvaliteta i greške u proizvodnji trajnih kobasic, Monografija, Kvalitet mesa i proizvoda od mesa, Izdavač: Novosadski sajam, Novi Sad, 2000.
8. Tojagić S. Izrada sremske kobasice u domaćinstvu kao preteča industrijske proizvodnje. Tehnologija mesa 1996; 6: 261-5.
9. Turubatović L, Hadžiosmanović M, Čaklovica F, Petrohilou I. Results of physicochemical and sensorical investigation of different type of fermented sausages during fermentation and ripening process; 50th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, August 8th-13th, 2004, 204.
10. Turubatović L, Tadić R. Standard operating procedure (SOP) for the production of traditionally fermented sausages. Proceedings workshop for dissemination of the project results "Safety of traditional fermented sausages: Research on protective cultures and bacteriocins", University of Sarajevo, Faculty of Veterinary Medicine, 2005.
11. Vesović Moračanin Slavica. Uticaj *Lactobacillus sakei* I 151, bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131 i MAP na održivost Sremske kobasice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, 2007.
12. Vesović S. „Bakteriocini BMK – Mogućnosti primene u proizvodnji fermentisanih kobasic“, idavač: Zadužbina Andrejević, 2009 god.

ENGLISH

STANDARD WORKING PROCEDURES IN PRODUCTION OF TRADITIONALLY FERMENTED SREMSKA SAUSAGE

**Slavica Vesović Moračanin, L. Turubatović, M. Rašeta, S. Stefanović, S. Janković,
Marija Škrinjar**

Investigations conducted within project "Technological and protective characteristics of autochthonous strains of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented sausages and possibilities for their implementation in the meat industry" (Project Number: 20127), financed on behalf of the Ministry for Science and Technology of the Republic of Serbia, have provided an answer on the characteristics of the quality of the used raw materials for the production of Sremska sausage – one of the most well-known Serbian traditionally fermented sausages (choice of meat, fatty tissue, additives and spices), and data have been registered in connection with the procedures of their processing, microclimatic conditions have been established (temperature, relative humidity, and air circulation) during the entire process of production and fermentation, as well as the presence and types of microorganisms, primarily lactic acid bacteria (BMK), the carrier of lactic fermentation. The most important characteristics of the filling have been established, the smoking regimen, the regimens of fermentation, maturing, drying, as well as the parameters for quality and safety of the finished product.

At the same time, the standard working procedure has been determined for the preparation of the meat, fatty tissue, the forming and inserting of the filling into the wrappers, as well as the characteristics of the finished products. The given standard working procedure should serve as a guideline for the meat industry in the production process of this traditional fermented sausage.

Key words: Sremska sausage, traditional fermented sausages, production parameters, standard working procedure

РУССКИЙ

**СТАНДАРТНЫЕ РАБОЧИЕ ПРОЦЕДУРЫ В ПРОИЗВОДСТВЕ "СРЕМСКОЙ"
ТРАДИЦИОННО ФЕРМЕНТИРОВАННОЙ КОЛБАСЫ**

**Славица Вескович Морачанин, Л. Турубатович, М. Рашета, С. Стефанович,
С. Янкович, Мария Шкриняр**

Испытания проведены в рамках Проекта "Технологические и протективные свойства автохтнны штаммов бактерий молочной кислоты, изолированных из традиционных ферментированных колбас и возможности их применения в мясной промышленности" (Учётный номер:20127), финансированного со стороны Министерства науки и технологического развития Республики Сербии, дали ответ о характеристиках качества входного сырья, назначенного для производства "сремской" колбасы-одной из наших самых знакомых традиционно ферментированных колбас (выбор мяса, жировой ткани, добавок и приправ), зарегистрированы данные, связанные для поступков их обработки, утверждены микроклиматические условия (температура, релативная влажность и циркуляция воздуха) в течение целого процесса производства и ферментации, словно и присутствие и вид микроорганизмов, в первую очередь бактерий молочной кислоты (БМК) носителей молочной ферментации. Утверждены важнейшие свойства начинки, режимы копчения, ферментации, созревания, сушки, словно и параметры качества и безопасности готового продукта.

Одновременно, определены стандартные рабочие процедуры (СРП) для подготовки мяса, жировой ткани, формирование и наполнение фарша в оболочки, словно и характеристики готовых продуктов. Приведённые СРП-ы нужны послужить как проводник мясной промышленности в процессе производства этой традиционной ферментированной колбасы.

Ключевые слова: сремская колбаса, традиционные ферментированные колбасы, производственные параметры, стандартные рабочие процедуры

FIZIOLOGIJA SLOBODNIH RADIKALA^{*} PHYSIOLOGY OF FREE RADICALS

Jelka Stevanović, Sunčica Borozan, S. Jović, I. Ignjatović^{**}

Slobodni radikali podrazumevaju svaki atom, molekul, jon, grupu atoma ili molekula sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. U njih spadaju: azot-oksid (NO^{\bullet}), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), peroksilni radikal (ROO^{\bullet}), alkoksilni radikal (RO^{\bullet}) i hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2^{\bullet-}$). Međutim, u reaktivne kiseonične vrste ubrajamo i komponente bez nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali (tzv. reaktivni neradikalni agensi), kao što su: singlet kiseonik (${}^1\text{O}_2$), peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\bullet-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipoхlorasta kiselina (npr. HOCl) i ozon (O_3).

Visoke koncentracije slobodnih radikala izazivaju oksidativni stres koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata. Međutim, niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju sasvim normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, igraju višestruke značajne uloge u mnogim reakcijama. Neke od njih su: regulacija signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, uloga hemoatraktanata i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, učešće u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomoć ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja (npr. izazvanih fizičkim radom), uloga u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, kao i doprinos regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva.

Ključne reči: slobodni radikali, izvori, uloge

Molekulske kiseonike, koji je suštinski važan za proizvodnju energije, jednovalentnom redukcijom, može proizvesti reaktivne međuproizvode, koji na kraju daju kratkoživeće ali hemijski vrlo aktivne slobodne radikale (SR). Pod tim se podrazumeva svaki atom, molekul, jon, grupa atoma ili molekul sa jednim ili više

* Rad primljen za štampu 25. 10. 2010. godine

** Dr sci. vet. med. Jelka Stevanović, profesor, dr sci. Sunčica Borozan, profesor, mr sci. vet. med. Slavoljub Jović, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr med. Igor Ignjatović, asistent Klinika za digestivnu hirurgiju - I hirurška klinika, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. Premda su im koncentracije relativno niske (npr. superoksid anjon radikala ima svega 30-300 femtograma/g tkiva) i imaju vrlo kratak poluživot (tabela 1), slobodni radikali su hemijski veoma reaktivni. Naime, njihov kiseonik je neuporedivo reaktivniji od molekulskog kiseonika iz vazduha (Noguchi i Niki, 1999; Marlin i sar., 2002).

Tabela 1. Poluživot reaktivnih metabolita (Halliwell i Gutteridge, 1999) /
Table 1. Half-life of reactive metabolites (Halliwell and Gutteridge, 1999)

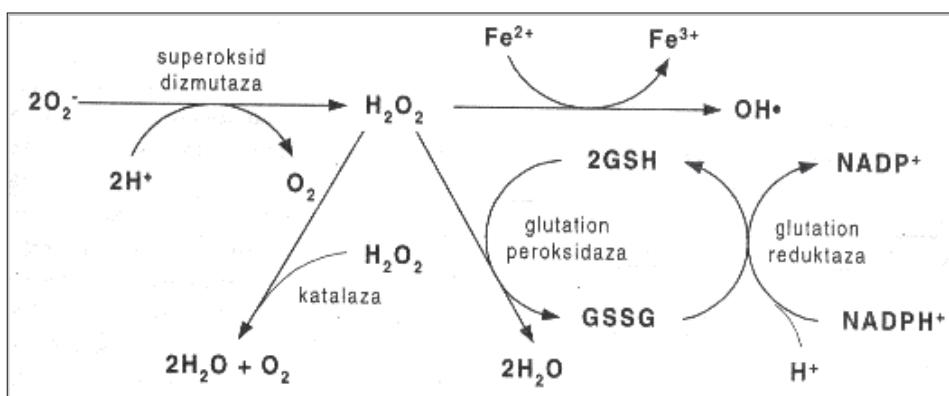
| | Simbol / Symbol | Naziv / Name | Poluživot / Half-life |
|------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| Radikali / Radicals | O ₂ ^{•-} | Superoksid anjon radikal / <i>Superoxide anion radical</i> | 10-20 s |
| | HO ₂ [•] | Hidroperoksidni radikal / <i>Hydroperoxide radical</i> | 7 s |
| | OH [•] | Hidroksilni radikal / <i>Hydroxyl radical</i> | 10 ⁻⁹ s |
| | RO [•] | Alkoksil radikal / <i>Alcoxyl radical</i> | 10 ⁻⁶ s |
| | ROO [•] | Peroksil radikal / <i>Peroxy radical</i> | 7 s |
| | NO [•] | Azot-oksid radikal / <i>Nitrogen-oxide radical</i> | 5 s |
| Neradikali / Non-radicals | H ₂ O ₂ | Vodonik peroksid / Hydrogen peroxide | stabilan / stable |
| | ROOH | Hidroperoksid / Hydroperoxide | minutima stabilan / minutes-stable |
| | HOCl | Hipohlorasta kiselina / Hypochloric acid | stabilan / stable |
| | RNHCl | N-hloramin / N-chloramine | stabilan / stable |

U slobodne radikale ubrajamo reaktivne kiseonične vrste (ROS – Reactive Oxygen Species) i reaktivne azotne vrste (RNS – Reactive Nitrogen Species) – podgrupa oksidanasa koji nastaju od azot-oksida (Valko i sar., 2007). Zajedno, ROS i RNS, čine reaktivne kiseonične i azotne vrste (RONS – Reactive Oxygen and Nitrogen Species).

Slobodni radikali sa kiseonikom su: azot-oksid (NO[•]), superoksid anjon radikal (O₂^{•-}), hidroksilni radikal (OH[•]), peroksilni radikal (ROO[•]), alkoksilni radikal (RO[•]) i hidroperoksilni radikal (HO₂[•]). Osim njih, u reaktivne kiseonične vrste spadaju i reaktivne komponente bez nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, tzv. reaktivni neradikalni agenasi (tabela 1), kao što su: singlet kiseonik (¹O₂), peroksinitrit (ONOO[•]), vodonik-peroksid (H₂O₂), hipohlorasta kiselina (HOCl) i ozon – O₃ (Halliwell i sar., 1991; Halliwell i Gutteridge, 1999).

Iako su sposobni za samostalno postojanje (Aruoma, 1994; Close i sar., 2005), slobodni radikali su nestabilni, tj. hemijski visoko reaktivni, zato što nespareni elektron koji se nalaze u njihovoj spoljašnjoj orbitali teži da se stabilizuje sparivanjem sa drugim elektronom. Tako, kada radikali reaguju sa neradika-

lima nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali, odnosno dolazi do propagacije i stvaranja čitavog niza radikala koji su takođe veoma toksični, što znači da "radikali rađaju radikale" (Cheeseman i Slater, 1993; Close i sar., 2005). Primarni ćelijski slobodni radikali, superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) i azot-oksid (NO^{\cdot}), vrlo su reaktivni i brzo mogu da proizvedu seriju novih slobodnih radikala. Tako, na primer, superoksid-dismutaza (SOD) omogućava brzo razlaganje superoksid anjon radikala i nastanak vodonik-peroksida (H_2O_2), koji je neradikalni agens, ali koji reagujući sa Fe^{2+} (shema 1) prelazi u vrlo moćan hidroksilni radikal (OH^{\cdot}). Osim toga, superoksid anjon radikal i azot-oksid međusobno brzo reaguju, formirajući peroksinitrit a potom i ostale reaktivne azotne vrste.



Shema 1. Inaktivacija nekih slobodnih radikala /
Diagram 1. Inactivation of certain free radicals

Iako je većina slobodnih radikala nestabilna, ne može se reći da su baš svi nestabilni: tako su superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksi lradikal (OH^{\cdot}) sposobni da postoje i nezavisno (Halliwell i Gutteridge, 1999; Halliwell i sar., 1991). Zato se može reći da stepen reaktivnosti SR zavisi od vrste prisutnih radikala i onoga sa čim on može da reaguje. Međutim, ako radikal nađe na drugi radikal, reakcija ulazi u završnu fazu, tj. oni gube svojstva radikala. To ne znači da više ne predstavljaju opasnost po ćeliju, jer u prisustvu metala sa promenljivom valencijom (gvožđe i bakar), kao što je već izneto, stvaraju nove, vrlo moćne radikale ili jone koji utiču na strukturu njenih biomakromolekula i oštećuju ćeliju.

Proizvodnja slobodnih radikala / Production of free radicals

Proizvodnju slobodnih radikala podstiču egzogeni i endogeni oksidansi kojima je organizam konstantno izložen. Egzogeni oksidansi su: ozon, smog, ionizujuće zračenje (Borožan i sar., 2004), višak jona prelaznih metala (Halliwell i Gutteridge, 1999; Božić i sar., 2003; 2003a; Gađanski-Omerović i sar., 2003; Aleksić i sar., 2004; 2004a; Božić i sar., 2004; Stevanović i sar., 2005; Jović i sar.,

2009), metabolizam toksičnih jedinjenja i lekova, ksenobiotici, višak kiseonika, odnosno njegova povećana koncentracija i sl. (Ivanović i sar., 2007; Stajković i sar., 2009). Ovi agensi posebno napadaju disajne puteve i plućno tkivo (Movat, 1985; Jenkins, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1999; Stevanović i sar., 2010). Tako, na primer, ozon izaziva plućni oksidativni stres kod konja (Deaton i sar., 2005).

Endogeni izvori RONS su ćelije različitih tkiva (Halliwell i Gutteridge, 1999; Božić i sar., 2003; 2003a; Radovanović i sar., 2004). Pretežno nastaju u njihovim mitohondrijama, mikrozomima, citosolu i endoplazmatskom retikulumu, mada ih poizvode i sve ćelijske membrane (plazma membrana, jedrova membrana, membrana mitohondrija i sl.), peroksizomi, lizozomi i dr. Kada govorimo o procesima tokom kojih nastaju slobodni radikali, to su pre svega mitohondrialni respiratorni lanac, katalitičke reakcije odgovarajućih enzima (npr. endotelne ksantin-oksidaze i NO-sintaza) i povećana fagocitna aktivnost na mestu oštećenja tkiva. Međutim, slobodni radikali nastaju i tokom metabolizma arahidonske kiseljine, odnosno sinteze eikosanoida u peroksizomima (delovanjem ciklooksigenaze, lipoksigenaže i citohroma P-450), prilikom oslobođanja hem proteina (uglavnom iz hemoglobina i mioglobina), usled smanjenja zaštitnog kapaciteta ćelija, oksidativnog hidroksilovanja u mikrozomima, razlaganja kateholamina, peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, reakcija oksido-redukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencijom, kao što su gvožđe i bakar (Movat, 1985; Jenkins, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1999).

Glavni endogeni izvor slobodnih radikala je respiratori lanac prenosa elektrona u mitohondrijama (Cai i sar., 2000; Ereklioglu i sar., 2003), odnosno nepotpuna redukcija kiseonika za vreme oksidativne fosforilacije. Tada se 1-3% kiseonika može prevesti u superoksid-anjonradikal ($O_2^{\bullet-}$). Ovaj način proizvodnje ROS je posebno važan tokom fizičke aktivnosti, jer se tada koristi preko 40 puta više kiseonika nego tokom mirovanja (Art i Lekeux, 1993; Stevanović i sar., 2010; Jović i sar., 2010). Drugi po značaju endogeni izvor ROS su enzimi koji fiziološki proizvode oksidanse (npr. ksantin-oksidaze endotelnih ćelija, membranske oksidaze i NO-sintaze). Treći po značaju endogeni izvor ROS je autooksidacija malih molekula tokom respiratornog praska u aktiviranim fagocitima (ćelijama monocitno-makrofagnog sistema, eozinofilnim i neutrofilnim granulocitima) tokom inflamatornog odgovora (Jackson i O'Farrell, 1993; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004).

O intenzitetu proizvodnje slobodnih radikala odlično govorи podatak da se od ukupno oko 250 g kiseonika koga zdrav čovek dnevno udahne 2-5% prevedе u toksični superoksid anjon radikal, a gotovo 5% ukupne normalne mitohondrijalne potrošnje kiseonika oslobođa singlet kiseonika – 1O_2 (Kehler, 1993).

Uloge reaktivnih kiseoničnih vrsta / Roles of reactive oxygen types

Kada su otkriveni, slobodni radikali su smatrani vrlo štetnim, ali se poslednjih dvadesetak godina sve više govorи i o njihovim korisnim ulogama. Naime, za razliku od visokih koncentracija slobodnih radikala, što vode u razvoj

oksidativnog stresa koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju sasvim normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, igraju višestruke značajne uloge u mnogim reakcijama. Neke od njih su: regulacija signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, uloga hemoatraktanata i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, zatim učešće u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomoći ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja (npr. izazvanih fizičkim radom), uloga u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, kao i doprinos regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva.

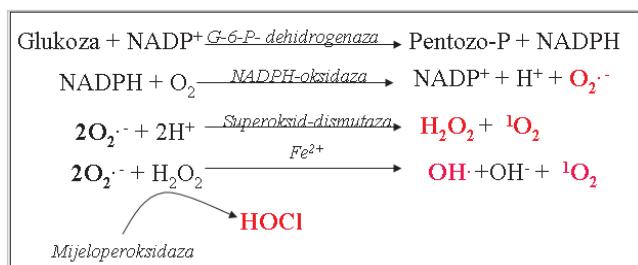
Uloga u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije podrazumeva, na primer, oksidaciju rianodinskih receptora, kojom superoksid-anjonradikal podstiče oslobođanje Ca^{2+} iz depoa u sarkoplazmatskom retikulumu skeletno-mišićnih ćelija i na taj način modulira snagu voljnih mišićnih kontrakcija (Stamler i Meissner, 2001). Osim toga, i azot-oksid (NO), koga proizvode skeletni mišići, ima ulogu endogenog modulatora njihove kontraktilnosti. Naime, interakcijom sa rianodinskim receptorima ili posredstvom cGM, ovaj slobodni radikal takođe modulira oslobođanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatičnog retikuluma (Eu i sar., 2000), tako da i on menja razdražljivost i kontraktilnost skeletnih mišića (Stamler i Meissner, 2001; Reid i Durham, 2002). Uz to, azot-oksid učestvuje u međućelijskoj signalizaciji i na druge načine. Funkcioniše kao jedan od neurotransmitera na sinapsama (Stark i Szurszewski, 1992; Taddei i sar., 1998; Isenovic i La Pointe, 2000) i doprinosi regulaciji vaskularnog tonusa (Isenovic i sar., 2001), odnosno vaskularizaciji tkiva, tako što funkcioniše kao lokalni vazodilatator*** (Han i Liao, 2005). Učestvuje i u regulaciji angiogeneze (Ziche i Morbidelli, 2000), kontroli peristaltike (Burnett, 1995), regulaciji reproduktivnih funkcija (Thaler i Epel, 2003), zarastanju površinskih rana (Frank i sar., 2002), metabolizmu glukoze (Roberts i sar., 1997), aktivaciji mastocita (Coleman, 2002), funkcionisanju srca (Isenovic i sar., 2001) i sl.

Mnogi efekti slobodnih radikala mogu uslediti oslobođanjem ili aktivacijom sekundarnih inflamatornih medijatora. Dosadašnje studije pokazuju da receptori za vezivanje brojnih peptidnih faktora rasta stimulišu produkciju ROS, kao i da je oksidativni prasak fagocita potreban za određeni aspekt signalizacije (Finkel i Halbrook, 2000; Droege, 2002). U tom smislu je potvrđena uloga oksidana kod signalizacije koju obavljaju: insulinski faktori rasta - IGF (Isenovic i sar., 2001), vaskularni endotelni faktor rasta - VEGF (Colavitti i sar., 2002; Finkel, 2003), faktor nekroze tumora - TNF α i interleukin 1 β - IL-1 β (Finkel, 2003). Dalji dokaz veze između nastanka ROS i prenosa signala pruža podatak da TRAF₄, koji je sastavni deo TNF, prenosi signal tako što se vezuje direktno za komponentu kompleksa NADPH-oksidaza (Finkel, 2003).

*** Azot-oksid je ranije bio poznat kao faktor relaksacije vazomotora poreklom iz endotela, tj. EDRF (engl. *Endotel Deriver Relaxing Factor*).

Budući da su reaktivne kiseonične vrste moćni hemoatraktanti i aktivatori leukocita, esencijalne su i za antimikrobnu aktivnost i uklanjanje ćelijskih ostanaka (Barnes, 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004; Radivojević i sar., 2004). Razarenje tkiva pomoću slobodnih radikala, posebno sa hidroksilnim radikalom (OH^{\cdot}), stimuliše antimikrobnu aktivnost fagocitnih ćelija za vreme respiratornog praska (Movat, 1985; Kehrer, 1993; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004). Za odbranu domaćina je posebno važna sposobnost neutrofilnih granulocita za produkciju ROS i njihovu specifičnu upotrebu u borbi protiv mikroorganizama (Smith, 1997; Close i sar., 2005). Naime, leukociti proizvode slobodne kiseonične radikale tokom fagocitoze. Respiratori prasak otpočinje odmah po unosu stranog tela u fagocit (npr. neutrofili granulocit ili monosit) a podstiču ga neki citokini (npr. IL1 i TNF), pod dejstvom NADPH-oksidaze, multienzimskog sistema koji generiše sintezu slobodnih kiseoničnih radikala.

U mitochondrijama fagocita dolazi do konverzije molekulskog kiseonika u slobodne radikale i neke neradikalske agenze (shema 2), odnosno u: superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot\cdot}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), hipohlorastu kiselinu (HOCl), vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik (${}^1\text{O}_2$). Tako, aktivacijom NADPH-oksidaze nastaje superoksid anjon radikal, a njegovom dismutacijom se dobijaju vodonik-peroksid i singletni kiseonik (shema 2). Istovremeno, lizozomalna mijeloperoksidaza (MPO) omogućava nastanak hipohloraste kiseline – HOCl , i hidroksilnog radikala – OH^{\cdot} (Halliwell i Gutteridge, 1999; Yanaka i sar., 1997; Božić i sar., 2003). Njihova proizvodnja je neophodna, zato što omogućavaju uništavanje materije unete u fagozome. Ovo postižu tako što oksidaciom inaktivisu membranske lipide, najrazličitije intracelularne proteine (npr. enzime i receptore), genetski materijal (DNA i RNA) i sl. Superoksid anjon radikal, hipohlorasta kiselina i hidroksilni radikali mogu reagovati sa nezasićenim masnim kiselimama membranskih lipida, tako što iniciraju njihovu peroksidaciju i tako omo-



Shema 2. Proizvodnja superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot\cdot}$), vodonik peroksid-a (H_2O_2), singletnog kiseonika (${}^1\text{O}_2$), hidroksilnog radikala (OH^{\cdot}) i hipohloraste kiseline (HOCl) u neutrofilnim granulocitima tokom oksidativnog praska /

Diagram 2. Production of superoxide-anion radicals ($\text{O}_2^{\cdot\cdot}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (${}^1\text{O}_2$), hydroxyl radical (OH^{\cdot}) and hypochloric acid (HOCl) in neutrophil granulocytes during oxidative burst

gućavaju destrukciju i uklanjanje na primer bakterijskih membranskih lipida (Moncado i Higgs, 1993; Close i sar., 2005). Konačno, proizvedeni slobodni radikali, svaki na svoj način, doprinesu liziranju bakterijskih ćelija u roku od 30 do 60 minuta, naravno, uz veliki utrošak kiseonika. Zato se kiseonični radikali i druge toksične vrste, proizvedene od strane NADPH-oksidaze i MPO, smatraju direktno odgovornim za uništavanje mikroorganizama. Međutim, moramo da istaknemo da oni nisu dovoljni za uništavanje bakterija, već je za to najvažnije oslobađanje neutrofilnih proteaza (Reeves i sar., 2002; Finkel, 2003).

Osim slobodnih radikala koje dobijaju zahvaljujući aktivnosti NADPH-oksidaze i mijeloperoksidaze, makrofagi proizvode i citolitični azot-oksid koga koriste za uništavanje, ne samo bakterija, nego i malignih i tumorskih ćelija sopstvenog organizma. Iako sam nije jako toksičan, fagocitni azot-oksid je tako važan jer reaguje sa vodonik-peroksidom ili superoksidnim anjonom i tako omogućava proizvodnju jako toksičnog peroksinitritnog radikala (ONOO^-) i azot(IV)-oksid radikala (NO_2^{\bullet}) koji ubijaju bakterije, gljivice, helminte i tumorske ćelije.

Doprinos ROS koji nastaju u fagocitima nije samo u degradaciji patogena i oštećenih ćelija sopstvenih tkiva, nego i u tome što aktivirani fagociti oslobađaju ROS i da bi indukovali migraciju leukocita, jer su moćni hemoatraktanti i aktivatori ovih ćelija (Barnes, 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994; Stevanović i sar., 2010; Jović i sar., 2010), i kako bi razvili inflamatorni odgovor, kojim otpočinje oslobađanje drugih inflamatornih medijatora, kao što su: eikosanoidi, citokini i proteaze (Movat, 1985; Halliwell i Gutteridge, 1999; Barnes, 1990; Sjodin i sar., 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994).

Od ostalih fizioloških uloga slobodnih radikala treba istaći učešće u integrinima posredovanom, održavanju, promeni položaja i oblika ćelija. Osim toga, stimulacijom transkripcionih faktora (HSP1, NF_κB i dr.), slobodni radikali kontrolišu gensku ekspresiju i tako podstiču sintezu proteina i normalan rast ćelija.

Neosporno je da slobodni radikali pomažu adaptaciju i oporavak tkiva posle oštećenja na više načina. Naime, podstiču oštećene ćelije da uđu u programiranu ćelijsku smrt – apoptozu (Kim i sar., 2001; Stevanović i sar., 2002; Radovanović i sar., 2004), a takođe indukuju privlačenje leukocita u oštećeno tkivo, aktiviraju ih i, kao što je već opisano, značajno učestvuju u njihovoј fagocitnoj ulozi. Na taj način, slobodni radikali potpomažu uklanjanje oštećenih ćelija iz tkiva i tako ubrzavaju njihov oporavak. Ako tome dodamo i ulogu slobodnih radikala u podsticaju sinteze nekih biološki aktivnih jedinjenja (npr. NO, kao vazodilatatornog i angiogenog transmitera) i stimulaciji normalnog rasta ćelija, jasno je da su oni uključeni u kompletan tok oporavka tkiva, od uklanjanja oštećenih ćelija do njihove zamene novim. Međutim, ovde se mora istaći da, osim u uklanjanju oštećenih ćelija, slobodni radikali učestvuju i u ćelijskom starenju.

Slobodni radikali su uključeni i u proizvodnji energije. Tako, na primer azot-oksid ima ulogu u metabolizmu glukoze (Roberts i sar., 1997). On je potreban

i za diferencijaciju razvojnih oblika eritrocita, jer inhibira rast, diferencijaciju i hemoglobinizaciju primarnih ćelija eritrocitne loze (Cokic i Schechter, 2008).

Ako imamo u vidu mnoštvo navedenih, potpuno fizioloških i veoma korisnih delovanja najrazličitijih slobodnih radikala, jasno je da su oni neophodni za život i opstanak, ali naravno, samo kada se sintetišu u normalnim količinama, jer čim njihova sinteza prevaziđe kapacitet tzv. antioksidativne odbrane organizma dolazi do oksidativnog stresa. On se manifestuje najrazličitijim oštećenjima biomolekula (proteina, DNK, lipida i ugljenih hidrata) i, shodno tome, vodi u seriju poremećaja funkcija različitih ćelija, tkiva, pa i kompletног организма (Borozan i sar., 2002; 2009).

Zaključak / Conclusion

Doskorašnja shvatanja da su slobodni radikali štetni agensi, zato što izazivaju oksidativni stres, koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, opovrgavana su poslednjih dvadesetak godina, podacima koji pokazuju da niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju tokom normalnih metaboličkih aktivnosti ćelije, imaju višestruki značaj u mnogim reakcijama. Naime, dokazano je da slobodni radikali učestvuju u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, indukciji hemotakse, aktiviranju leukocita, u fagocitozi, u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomažu ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja, doprinose normalnom ćelijskom rastu, učestvuju u programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, doprinose regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva i dr.

ZAHVALNICA :

Rezultati rada su deo naučno istraživačkog projekta u oblasti osnovnih istraživanja, evidencijski broj 173034 finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura / References

1. Radovanović A, Stevanović J, Gledić D. Apoptoza kao način prirodnog odumiranja ćelija jajnika. Vet glasnik 2004; 58(1-2): 43-54.
2. Art T, Lekeux P. Training-induced modification in cardiorespiratory and ventilatory measurements in thoroughbred horses. Eq Vet J 1993; 25: 532-6.
3. Aruoma OI. Free radicals and antioxidant strategies in sports, J Nutr Biochem 1994; 5: 370-81.
4. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation, Free Radical Biology and Medicine 1990; 9: 235-43.
5. Borozan SZ, Gadjanski-Omerovic GN, Stajkovic SS. Effects of ionizing radiation on antioxidant system in human erythrocytes, Central European Journal of Occupational and Environmental Health 2004; 10(1): 12-7.

-
6. Borožan S, Djurdjić V, Stajković S. Slobodni radikali i antioksidativna odbrana. Zbornik Predavanja XXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Beograd 2002, P121-31.
 7. Borožan S, Gopčević K, Jović S, Gojgić-Cvijović G. Oxidative damage of human plasma proteins induced by benzene, 12th EuCheMS International Conference on Chemistry and Environment, Abstracts, Stockholm University, Stockholm, Sweden, 14-17. June, 2009, Tox P36.
 8. Božić T, Stevanović J, Kovačević M, Jović S, Lukić S, Petakov M, Borožan S, Mijačević Z, Knežević M, Bulajić S. Toluene mediated oxidative stress and granulomonocitopoiesis, *Acta Veterinaria* 2003; 53(4): 201-10.
 9. Božić T, Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Borožan S, Popović D, Todorović D. Possible effects of depleted uranium (du): i changes in cellular and biochemical values in peripheral blood of ruminants in exposed areas, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2003a; 9(4): 267-71.
 10. Božić T, Stevanović J, Popović D, Vlaški M, Fišter S, Kovačević-Filipović M. Possible health effects of depleted uranium (du): examination of peripheral blood of ruminants in exposed areas, 22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Olsztyn, Poland, 2004: 56.
 11. Burnett AL. Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review, *Urology* 1995; 45: 1071-83.
 12. Gadjanski-Omerović GN, Borožan SZ, Božić TP, Popović DLj. Possible effects of depleted uranium (DU): II. Damage of liver and kidney malfunction in animals of exposed areas, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2003; 9(4): 273-8.
 13. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg PJ, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE, *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 205-21.
 14. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry, *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
 15. Close GL, Ashton TA, McArdle A, McLaren DP. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury Comparative Biochemistry and Physiology 2005; Part A 142: 257-66.
 16. Cokic VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype, *Curr Top Dev Biol* 2008; 82: 169-215.
 17. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzевino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002; 277(5): 3101-8.
 18. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 4-10.
 19. Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC, Roberts CA, Harris PA, Schroter RC, Kelly FJ. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Vet J* 2005; 37: 243-9.
 20. Droege W. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
 21. Duarte JA, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell HJ. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery?, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994; 68(1): 48-53.

22. Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions, *Cell* 2000; 102: 499–509.
23. Evereklioglu C, Hamdi E, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration, *Documenta Ophthalmologica* 2003; 106: 129-36.
24. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 2000; 408: 239-47.
25. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress, *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 247-54.
26. Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Pfeilschifter J. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator, *Kidney Int* 2002; 61: 882-8.
27. Gilmour MI, Park P, Selgrade MK. Ozone-enhanced pulmonary infection with *Streptococcus zooepidemicus* in mice, *American Review of Respiratory Diseases* 1993; 147: 753-60.
28. Halliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note, *Free Radic Biol Med* 1991; 10(6): 439-41.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine 3rd ed., New York: Oxford University Press, Oxford 1999; 140-84.
30. Han TH, Liao JC. Erythrocyte nitric oxide transport reduced by a submembrane cytoskeletal barrier, *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723: 135-42.
31. Isenovic E, LaPointe M. Role of Ca⁺⁺ phospholipase A₂ on regulation of inducible nitric oxidesynthase, *Hypertension* 2000; 35: 249-54.
32. Isenovic RE, Muniyappa R, Milivojevic N, Rao Y, Sowers JR. Role of PI3-kinase in isoproterenol and IGF-1 induced ecNOS activity, *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 954-8.
33. Ivanović S, Borožan S, Jezdimirović M, Aleksić N, Milovanović M, Tomašević-Čanović M, Đurđević S. The application of adsorbent bentonite in oxidative stress induced by paraquat. *Acta Veterinaria* 2007; 57(4) 329-40.
34. Jackson MJ, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage, *Br Med Bull* 1993; 49: 630-41.
35. Aleksić J, Lukić S, Jović S, Kovacević-Filipović M, Vlaški M, Stevanović J, Božić T, Popović D. Investigation of oxidative stress in sheep bred in areas exposed to depleted uranium (du) ammunition, *Oxidative stress and mechanisms of protection*; 2004 May 28-29; Kragujevac: 2004.
36. Aleksić J, Lukić S, Jović S, Kovacević-Filipović M, Vlaški M, Stevanović J, Božić T, Popović D. Investigation of oxidative stress in sheep bred in areas exposed to depleted uranium (DU) ammunition, *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 2004; 40(1-3): 139-44.
37. Stevanović J, Radovanović A, Merćep D. Apoptoza kao način umiranja ćelije; signali, biohemijiske i morfološke karakteristike, 23. Seminar za inovacije znanja veterinara 2002 Februar 13-14; Beograd.
38. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
39. Jović S, Aleksić J, Krsić A, Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Borožan S, Božić T, Popović D. A study on oxidative stress and complete blood count of sheeps breed in the area exposed to depleted uranium (du) ammunition, *Acta Veterinaria* 2009; 59 (5-6): 481-8.

-
40. Jović S, Stevanović J, Borožan S, Jović S, Trailović D, Značaj azot-monoksida tokom fizičkog opterećenja trkačkih konja, I Regionalno savetovanje "Uzgoj, reprodukcija i zdravstvena zaštita konja" 2010 Oct. 1-3;Novi Sad.
 41. Kehler JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Crit Rev Toxicol 1993; 23(1): 21-48.
 42. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, Int Immunopharmacol 2001; 1: 1421-41.
 43. Lansing MW, Mansour E, Ahmed A, Cortes A, Garcia L, Lauredo IT, Wanner A, Abraham WM. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep, Am Rev Respir Dis 1991; 144(6): 1291-6.
 44. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, Deaton CD, Roberts CA, Harris PA, Dunster C, Kelly FJ. Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise, J Nutr 2002; 132: 1622S-7S.
 45. Moncada S, Higgs A. Mechanisms of disease – the L-arginine nitric oxide pathway. N Eng J Med 1993; 329.
 46. Movat HZ. The inflammatory Reaction, Amsterdam, Oxford: Elsevier Scientific Publications, 1985.
 47. Noguchi N and Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidant, In: Papas AM (Ed.), Antioxidant status, Diet, Nutrition and Health, CRC Press LLC, London, 1999.
 48. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux, Nature 2002; 416: 291-7.
 49. Reid MB, Durham WJ. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging, Ann NY Acad Sci 2002; 959: 108-16.
 50. Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent, Am J Physiol 1997; 273: E220-E225.
 51. Sjodin B, Hellsten Westling YH, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise, Sports Med 1990; 10: 236-54.
 52. Smith JA. Exercise immunology and neutrophils, Int J Sports Med 1997; 18: 46-55.
 53. Stajković SS, SZ Borožan, G Gađanski-Omerović. The effect of toluene on oxidative processes in rats blood, Journal of the Serbian Chemical Society 2009; 74, 15-25.
 54. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle, Physiol Rev 2001; 81(1): 209-37.
 55. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastroin-testinal and hepatic function and disease, Gastroenterology 1992; 103: 1928-49.
 56. Stevanović J, Borožan S, Jović S, Trailović D, 2010. Oksidativni stres kod trkačkih konja. I Regionalno savetovanje "Uzgoj, reprodukcija i zdravstvena zaštita konja" 2010 Oct. 1-3, Novi Sad.
 57. Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Vlaški M, Popović D, Borožan S, Jović S, Božić T. A study on oxidative stress and peripheral blood parametars of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition. Acta Veterinaria 2005; 55(4): 269-78.
 58. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension: Fact or fancy?, J Cardiovasc Pharmacol 1998; Suppl 3: 41-8.

59. Thaler CD, Epel D. Nitric Oxide in Oocyte Maturation, Ovulation, Fertilization, Cleavage and Implantation: A lit-tle dab'll do ya, Curr Pharm Des 2003; 9: 399-409.
60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. Int J Biochem C Bilo 2007; 39: 44-84.
61. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, Skubitz AP, Furcht LT, Low WC. Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia, J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17(6): 605-11.
62. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis, J Neurooncol 2000; 50: 139-48.

ENGLISH

PHYSIOLOGY OF FREE RADICALS

Jelka Stevanović, Sunčica Borozan, S Jović, I Ignjatović

Free radicals imply that every atom, molecule, ion, group of atoms, or molecules with one or several non-paired electrons in outer orbital. Among these are: nitrogen-oxide (NO^{\bullet}), superoxide-anion-radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), peroxy radical (ROO^{\bullet}), alcooxyl radical (RO^{\bullet}) and hydroperoxy radical (HO_2^{\bullet}). However, reactive oxygen species also include components without non-paired electrons in outer orbital (so-called reactive non-radical agents), such as: singlet oxygen (${}^1\text{O}_2$), peroxy nitrite (ONOO^-), hydrogen-peroxide (H_2O_2), hypochloric acid (eg. HOCl) and ozone (O_3).

High concentrations of free radicals lead to the development of oxidative stress which is a precondition for numerous pathological effects. However, low and moderate concentrations of these matter, which occur quite normally during cell metabolic activity, play multiple significant roles in many reactions. Some of these are: regulation of signal pathways within the cell and between cells, the role of chemoattractors and leukocyte activators, the role in phagocytosis, participation in maintaining, changes in the position and shape of the cell, assisting the cell during adaption and recovery from damage (e.g. caused by physical effort), the role in normal cell growth, programmed cell death (apoptosis) and cell ageing, in the synthesis of essential biological compounds and energy production, as well as the contribution to the regulation of the vascular tone, actually, tissue vascularization.

Key words: free radicals, sources, roles

РУССКИЙ

ФИЗИОЛОГИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Елка Стеванович, Сунчица Борозан, С. Йович, И. Игњатовић

Свободные радикалы подразумевают каждый атом, молекул, ион, группу атомов или молекул с одним или больше неспаренных электронов во внешнем

круге. К ним относятся: азот-оксид (HO^*), супероксид-анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (OH^*), пероксильный радикал (ROO^*), альлоксильный радикал (RO^*) и гидропероксильный радикал (HO_2^*). Между тем, в реактивные кислородные виды включаем в число и компоненты без неспаренных электронов во внешней сфере действия (так называемые реактивные нерадикальные агенты), как суть: синглет (одиночный) кислород (${}^1\text{O}_2$), пероксинитрит (ONOO^*), водород-пероксид (H_2O_2), гипохлористая кислота (например HOCl) и озон (O_3).

Высокие концентрации свободных радикалов ведут в развитие окислительного стресса, который предварительное условие многочисленных патологических эффектов. Между тем, низкие и умеренные концентрации этих веществ, возникающие совсем нормально в течение метаболической активности клетки, играют многосложные значительные роли в многих реакциях. Некоторые из них суть: регулировка сигнальных путей внутри клетки и между клетками, роль гемоатрактантов и активаторов лейкоцитов, роль в фагоцитозе, участие в удержании, изменении положения и формы клетки, помочь клетке в течение адаптации и поправки от повреждения (например вызванных физическим трудом), роль в нормальном клеточном росте, программирующей клеточной смерти (апоптозе) и клеточном старении, в синтезе эссенциальных биологических соединений и производстве энергии, словно и вклад регулировке сосудистого тонуса, то есть сосудистости ткани.

Ключевые слова: свободные радикалы, источники, роли

**POVREDE I POREMEĆAJI ZDRAVLJA VETERINARA
NEINFECTIVNE ETIOLOGIJE***
**INJURIES AND NONINFECTIVE HEALTH DISORDERS
OF VETERINARIANS**

Marijana Vučinić**

U stručnoj i naučnoj literaturi nalazi se dosta publikovanih rezultata koji se odnose na različitu učestalost, vrstu i faktore rizika profesionalnih povreda i zdravstvenih poremećaja veterinara. Veterinarska delatnost je rizična. Veterinari obavljaju svoju delatnost pod neudobnim i nesigurnim okolnostima ne samo u smeštajnim objektima za životinje već i u svojim klinikama, ambulantama i operacionim salama vlažnih i klizavih podova. Dolaze u najbliži kontakt sa životnjama usled čega postoji visok rizik da ih životinje povrede. Veterinari često obavljaju zahvate koji su za životinju bolni i stresogeni i koji kod životinja provozi odbrambene reakcije različitih oblika kao što su ugrizi, ritanje, grebanje i sl. U svom radu, veterinari su izloženi uticaju rizičnih materijala i opreme i mnogim drugim rizicima kao što su ionizujuće zračenje, onkogeni virusi, oštri instrumenti, inhalacioni anestetici, pesticidi (insekticidi), prekovremeni rad i profesionalni stresori. Veterinari često rade sa nepoznatim životnjama, nepoznatim ljudima i zahtevnim klijentima. Sve su to razlozi zbog kojih veterinari nisu samo izloženi povećanom riziku od profesionalnih povreda i bolesti već i povećanom riziku od smrti usled povreda na radu, saobraćajnih udesa, malignih oboljenja i suicida.

Ključne reči: veterinari, povrede, zdravstveni poremećaji

Uvod / Introduction

Kao i kod svih drugih profesija, tako je i kod veterinara prisutan rizik od pojave određenih profesionalnih bolesti¹, bolesti u vezi sa radom i povreda na radu². Za razliku od zaposlenih u srodnim profesijama, veterinari češće rade u neadekvatnim uslovima u prostorijama i smeštajnim objektima (klizavim podova

* Rad primljen za štampu 20. 12. 2010. godine

** Dr sci. vet. med. Marijana Vučinić, profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

usled nakupljene nečistoće u vidu fecesa, urina i drugih izlučevina životinja, neravnih podova, u nekomformim smeštajnim objekatima za životinje, nedovoljno osvetljenim, nedovoljno prostranim, uz prisustvo nečistoća koje smanjuju transparentnost vazduha i vidljivost, neadekvatnog veštačkog osvetljenja) ili na terenu, na otvorenom prostoru gde često ne postoje uslovi da se životinja na pravilan način obuzda, imobilise i pripremi za određenu intervenciju. Veterinari su često prinuđeni da zauzimaju vrlo neudobne i nebezbedne stavove i položaje tela pri kliničkom pregledu ili tretmanu životinja, da podižu životinje radi obavljanja pregleda kao i da obavljaju preglede i stručne zahvate na životnjama koje su usled poremećaja zdravstvenog stanja, prisutnog bola i straha sklone ispoljavanju različitih odbrambenih oblika ponašanja (Mosedale, 2009). Pored posebno nepovoljnih radnih okolnosti i uslova rada, želja za socijalnom i profesionalnom afirmacijom, veliki broj pacijenata u toku radnog vremena, prekovremen rad, zahtevi i očekivanja klijenata, motivisanost na zaradu i nedovoljno odmora i sna predstavljaju glavne činioce koji doprinose nastanku povreda i mnogih zdravstvenih poremećaja veterinara. U svetu su aktuelna istraživanja profesionalnih bolesti i povreda veterinara o čemu svedoči veliki broj publikovanih radova svake godine (Bartram i Baldwin, 2010; Fairnie, 2010; Kabuusu i sar., 2010; Olsen i sar., 2010; Platt i sar., 2010), a sve radi razmene informacija i pronalaženja najboljih rešenja radi unapređenja bezbednosti, zdravlja i opšte dobrobiti veterinara i smanjenja zdravstvenih rizika pri obavljanju delatnosti vezanih za veterinarsku profesiju.

Povrede veterinara / Injuries of veterinarians

Riziku od povreda posebno su izloženi mlađi i neiskusni veterinari, veterinarji koji rade sa velikim životnjama, "radoholičari", stariji veterinarji sa uznapredovalim hroničnim degenerativnim i inflamatornim poremećajima mišića, zglobova i kostiju, veterinarji skloni da ne koriste posebne kutije za nošenje oštih instrumenata i igala kao i veterinarji koji rade bez posebne opreme za obuzdavanje i podizanje životinja i oni veterinarji koji rade stalno u statičnom položaju. Nedovoljan odmor i san predstavlja posebnu opasnost jer smanjuje stepen pažnje. Povrede usled nedovoljno odmora i sna su česte kod terenskih veterinaraca u mešovitoj praksi. Poseban rizik od povreda postoji kod veterinaraca u privatnoj praksi koji su sami sebi ujedno i poslodavci jer manje pažnje posvećuju zaštiti na radu kao što odvajaju i manje sredstava za zaštitu od povreda pri radu i uopšte za sopstvenu

¹ Profesionalne bolesti jesu određene bolesti nastale u toku osiguranja, prouzrokovane dužim neposrednim uticajem procesa i uslova rada na radnim mestima, odnosno poslovima koje je osiguranik obavlja (videti Zakon o penzijskom i invalidskom osiguranju, Službeni glasnik RS 34/03, član 24).

² Povredom na radu smatra se ona povreda osiguranika koja se dogodi u prostornoj, vremenskoj i uzročnoj povezanosti sa obavljanjem posla po osnovu koga je osiguran, a prouzrokovana je neposrednim i kratkotrajnim mehaničkim, fizičkim ili hemijskim dejstvom, naglim promenama položaja tela, iznenadnim opterećenjem tela ili drugim promenama fiziološkog stanja organizma (videti Zakon o penzijskom i invalidskom osiguranju, Službeni glasnik RS 34/03, član 22. i 23).

zdravstvenu zaštitu i osiguranje (Gabel i Gerberich, 2002; Reijula i sar., 2003). Veterinari koji rade sami izložni su posebnom riziku ne samo usled zamora, već i u slučajevima posete nepoznatim klijentima i intervencija na životnjama koje takođe ne poznaju (Mosedale, 2009). Posebnu potrebu za uspehom i samodokazivanjem imaju mlađi i neiskusni veterinari. Mlađi veterinari imaju potrebu da rade više i brže, a na račun sopstvenog rizika i napažnje zarad lične promocije, bolje zarade i samodokazivanja (Smith i sar., 2009a).

Jeyaretnam i Jones (2000) su ustanovili da najčešće povrede veterinara nastaju usled ujeda pasa i mačaka, grebanja mačaka i udara ili nagnjećenja od strane velikih životinja. Istegnuća, iščašenja i povrede kičmenih pršljenova predstavljaju povrede koje se kod veterinara najduže leče, a nastaju ili pri podizanju teških životinja ili pri padovima usled klizanja i saplitanja. Gabel i Gerberich (2002) su proučavale faktore rizika za nastanak povreda veterinara. Kao glavne faktore rizika za nastanak povreda veterinara ustanovile su sledeće: postojanje prethodnih povreda, bavljenje sportom, aktivno pušenje i prekovremeni rad, odnosno noćni san kraći od 6 časova. Rizik od povreda usled podizanja teških životinja raste sa telesnom masom životinja. Dužina radnog staža, odnosno duže radno iskustvo smanjuje rizik od nastanka povreda kod veterinara. Nimbari i Aghazadeh (2004) su proučavali povrede veterinara čija je klinička praksa vezana za konje, velike životinje, kućne ljubimce i onih sa mešovitom kliničkom praksom. Ustanovili su da su veterinari koji rade sa malim životnjama, odnosno kućnim ljubimcima, mnogo više izloženi opasnosti od povreda nego veterinari koji rade sa ostalim životnjama. Kod sve četiri klase veterinara povrede nastaju usled klizanja, saplitanja, padova i pri podizanju životinja. I drugi istraživači su potvrdili da prekovremeni rad može biti jedan od glavnih uzroka nastanka povreda kod veterinara (Dembe i sar., 2005). Istraživanja profesionalnih povreda kod australijskih veterinara otkrila su da se 51% veterinara lakše ili teže povredi u toku radnog staža kao i da se najmanje 26% veterinara povredi u toku jedne godine (Fritschi i sar., 2006). U prvoj godini radnog staža posle diplomiranja, čak 42% veterinara zadobilo je povrede od životinja. Najveći broj veterinara pati od povreda mišića, zglobova i kostiju, a najčešće su povrede koje nanose kućni ljubimci ujedanjem i grebanjem. Veći broj povreda naneti od kućnih ljubimaca nastaje kod mlađih veterinara muškog pola u prvoj godini kliničke prakse. Inače su kolege (57% od 2679 ukupnog broja veterinara sa povredama) više izložene povredama od koleginica (43% od 2679 ukupnog broja veterinara sa povredama) zaposlenih u kliničkoj praksi, dok su veterinari koji rade sa velikim životnjama (69% povreda) i u kliničkoj praksi mešovitog tipa (59% povreda) više izložni riziku od nastanka teških telesnih povreda koje će imati hroničan karakter od veterinara zaposlenih u kliničkoj praksi sa malim životnjama kod kojih učestalost povreda iznosi 42%. Čak je 82% diplomiranih veterinara prikazalo povrede zadobijene od ujeda i grebanja mačaka u prvoj godini radnog staža, dok je 62% veterinara prikazalo povrede nastale ujedima i grebanjem pasa u prvoj godini radnog staža posle diplomiranja (Fritschi i sar., 2006). Rezultate obimnijih istraživanja profesionalnih telesnih povreda veteri-

nara u Australiji publikovali su Lucas i sar. (2009a). Prema njihovim istraživanjima najveći broj telesnih povreda veterinara nastaje na farmama (55%) u toku samog rada sa velikim životinjama kao što su klinički pregled ili pomeranje životinja. Povrede najčešće nastaju na rukama veterinara (33%), a zatim na glavi i licu (15%). U odnosu na vrste povreda, najčešće su otvorene rane (36%), frakture i dislokacije (27%), a na poslednjem mestu su lakše povrede mekih tkiva (12%). Kod veterinara nisu retka ni intrakranijalna oštećenja (3%) kao što su prisutni i slučajevi teških povreda ekstremiteta koji se završavaju amputacijom (1%). Najčešći mehanizam nastanka povreda je ujedanjem, udaranjem, gnječenjem i grebanjem. U najvećem broju slučajeva, povrede nanose goveda (22%), zatim konji (21%), psi (20%) i mačke (8%). Čak je 55% od ukupnog broja povređenih veterinara koristilo odgovarajuću zaštitnu opremu i primenjivalo mere opreza pri radu sa životinjama. Posle povređivanja najvećem broju veterinara ukazana je pomoć kod lekara opšte prakse (39%), dok je 23% veterinara bilo sposobno da sami sebi saniraju zadobijene povrede. U bolnicama je zbrinuto 32% veterinara od čega je 16% zahtevalo urgentnu pomoć (Lucas i sar., 2009a). Od 2188 teških telesnih povreda veterinara, više od 72% zadobijeno je od životinja, od čega su 453 povrede naneli konji (Lucas i sar., 2009b). Slučajevi povređivanja vezani su za ušivanje rana, obradu rana, sondiranje i peroralnu aplikaciju lekova kod konja. Glava, lice i donji ekstremiteti su najčešća predilekciona mesta povreda zadobijenih od konja, a frakture su najčešći tipovi povreda (Lucas i sar., 2009b). Za sva navedena istraživanja karakteristično je da je većina povređenih veterinara primenjivala mere opreza pri radu sa životinjama. Međutim, Fairnie (2010) navodi da većina teških telesnih povreda veterinara zadobijenih pri radu sa velikim životinjama nastaje usled neadekvatnih radnih uslova u smeštajnim objektima za životinje kao i usled nedostatka opreme za obuzdavanje životinja. Takođe, Fairnie (2010) je izvršila i tipizaciju teških telesnih povreda australijskih veterinara. Od teških telesnih povreda koje nanose konji najčešće su frakture lobanjskih kostiju. Pri radu sa govedima, najčešće su frakture kostiju donjih ekstremiteta. Većina povreda repetitivnog karaktera nastaje pri manuelnoj dijagnostici graviditeta kod kobila, krava i junica, dok lakše ili teže rane tipa posekotina nastaju pri porođaju velikih životinja usled korišćenja porodiljskih kuka i različitih vrsta sečiva. Kod veterinara koji rade sa velikim životinjama povrede i deformacije kičmenih pršljenova su česta pojava, dok su kod veterinara u kliničkoj praksi sa malim životinjama najčešći ujedi zadobijeni od pasa i mačaka.

Kod veterinara su u kliničkoj praksi česte i povrede medicinskim priborom. Na uzorku od 664 veterinara (Leggat i sar., 2009) ustanovljeno je da su povrede medicinskim instrumentima i priborom najčešće kod veterinarki (82,6%), u kliničkoj praksi mešovitog tipa (86,6%) i kliničkoj praksi sa malim životinjama (83,6%), kod manje iskusnih kolega, odnosno kod veterinara sa radnim stažom kraćim od 5 godina (89,9%), kod prezaposlenih veterinara sa aktivnim radom u toku jedne nedelje između 30 i 50 časova (80,1%) i prekovremenog rada, odnosno kod veterinara čija je radna nedelja duža od 50 časova (75,8%) i koji imaju

više od 50 pacijenata u toku radne nedelje (86,6%). Istraživanjima sprovedenim u Australiji (Leggat i sar., 2009) ustanovljeno je da je najveći broj povreda nanet injekcionim iglama (63,7%), zatim iglama za ušivanje (50,6%) i oštricom skalpela (34,8%). Povrede oštrim medicinskim priborom i instrumentima nisu retke ni kod veterinara sa radnim stažom dužim od 20 godina, tako da je njihova učestalost 66,9%.

Detaljna ispitivanja učestalosti i razloga uboda iglama veterinara sprovedena su među kanadskim veterinarima. Ispitivanjima sprovedenim u Kanadi ustanovljeno je da se od 226 veterinarskih radnika njih 210 (93%) u toku radnog staža povredilo iglama, od čega se za godinu dana iglama povredilo čak 167 (74%) veterinarskih radnika (Weese and Faires, 2009). Pri ubodu iglama veterinari su prikazivali različite vrste izloženosti opasnim materijalima (krv životinja, hemoterapeutici, prostanglandin, drugi lekovi i biološki preparati). Najveći broj veterinarskih radnika povredio se iglama 2 do 5 puta (47%) u toku radnog staža. Najmanji broj veterinarskih radnika (5,3%) povredio se iglama u toku radnog staža samo jednom. Kao razloge za povrede iglama od 226 veterinara čak je 113 (50%) navelo žurbu pri radu, odnosno preopterećenost poslom. Neodgovarajuće rukovanje iglama našlo se kao razlog na drugom mestu (61 veterinar, 27%). Na trećem mestu za ubode veterinara iglama navodi se neodgovarajuće obuzdavanje životinja (43 veterinar, 19%). Samo 17 veterinar (7,5%) kao razlog povrede iglama navelo je neposedovanje adekvatne opreme za nošenje igala (Weese and Faires, 2009).

Istraživanjima sprovedenim u Nemačkoj (Nienhaus i sar., 2005) ustanovljeno je da najveći broj povreda veterinara (87,7%) nastaje ipak povređivanjem od strane životinja (66%) kako pri radu sa malim (69,6%), tako i pri radu sa velikim životnjama (64,4%). U odnosu na mesto nastanka, najveći broj povreda pri radu sa velikim životnjama nastaje u smeštajnim objektima za životinje (90,5%), dok pri radu sa malim životnjama nastaje u samim ambulantama i klinikama (84,2%). Na drugom mestu po zastupljenosti kod nemačkih veterinara su povrede koje nastaju usled klizanja, saplitanja i padova (49%), a tek na trećem mestu su povrede nanete veterinarskom opremom i priborom (26%). Najveći broj veterinara u Nemačkoj koji rade sa malim životnjama povrede mačke (42,9%), dok veterinare koji rade sa velikim životnjama najčešće povrede konji (35,4%). Nemačke veterinare u maloj praksi, psi povrede u 31,3% slučajeva, a veterinare koji rade sa velikim životnjama goveda povrede u 29,2% slučajeva. Najveći broj povreda veterinara u Nemačkoj predstavljaju posekotine, ugrizne rane i ogrebotine (59,7%). Posle njih su najviše zastupljena neznatna telesna oštećenja koja su potpuno izlečiva. Za njima slede distorzije, luksacije i rupture. Ređe su frakture, akceleracione traume kičmenog stuba, teška telesna oštećenja kod kojih je oporavak nepotpun, a operkotine, kod veterinara zaposlenih u kliničkoj praksi, gotovo da ne postoje kao vrste povreda (Nienhaus i sar., 2005).

Najnovija istraživanja iz različitih delova sveta potvrđuju da su kod veterinara najčešće povrede koje nanose same životinje (72%) i to goveda (72%),

mačke (25%) i psi (23%), a da zatim slede povrede nanete iglama i oštrim instrumentima (15%) i na kraju povrede koje nanose ptice (13%). Okolnost pod kojima povrede najčešće nastaju predstavlja vakcinacija životinja (25%), a često rizik za povrede ne predstavlja niti pol, niti starost, niti iskustvo veterinara. Povrede gornjih ekstremiteta (28%) su najčešće (Kabuusu i sar., 2010). Takođe, veterinari su izloženi visokom riziku od povreda nastalih u saobraćajnim udesima, posebno oni koji se bave terenskim radom (Fritschi i sar., 2006, 2008). U ispitivanjima obavljenim sa 2562 veterinara zaposlenih u praksi sa velikim, malim životinjama ili praksi mešovitog tipa, 2028 veterinara koristilo je motorna vozila za obavljenja svoje delatnosti, dok je u ovom uzorku čak 681 veterinar u toku radne nedelje prelazio više od 200 km puta (Fritschi i sar., 2008).

Veterinarska profesija i stres / Veterinary profession and stress

Izvori stresa za veterinare su takođe mnogobrojni. Istraživanjima sprovedenim na Novom Zelandu (Gardner i Hini, 2006) došlo se do podataka koji ukazuju na to da su žene u veterinarskoj praksi sklonije stresu i depresijama od muškaraca. Ovim poremećajima su više skloni i veterinari koji rade sa malim životinjama i veteranari u mešovitoj praksi. Takođe, stresu su više skloni mladi veterinari od starijih veterinara. Kao glavni uzroci stresa identifikovani su prekovremeni rad, rad na poziv, visoki zahtevi i očekivanja klijenata i neispunjavanje očekivanog. Dodatni stresori su potreba za stalnim usavršavanjem i sticanjem novih znanja i veština, zatim međuljudski odnosi, finansijski problemi i visoki standardi koje veterinari postavljaju sami sebi (Gardner i Hini, 2006).

Istraživanjima sprovedenim u Australiji došlo se do sličnih rezultata o uzrocima stresa kod veterinara (Smith i sar., 2009a). Australijski veterinari su kao uzrok stresa navodili još preciznije podatke kao što su veliki broj radnih sati u toku dana bez dovoljno vremena za dnevni odmor kao i veliki broj radnih dana u toku godine i nedovoljno dug godišnji odmor, veliki broj pacijenata i kratak vremenski period između prijema pacijenata, nerazumevanje i nedovoljno vrednovanje veterinarske profesije od strane javnosti i nedovoljno vremena za pregled ili tretman po pacijentu. Činioci vezani za nedovoljno vremena za odmor i prekovremeni rad pripadaju prvoj grupi stresora za australijske veterinare. Pored nedostatka vremena za kvalitetan rad, u drugoj grupi stresora za australijske veterinare su nedovoljna zarada i sporo napredovanje u struci. Treća grupa stresora vezana je za sam rad veterinara i strahove koji prate veterinarsku delatnost kao što su strah od tužbi klijenata, strah od mogućnosti da ih životinje povrede i privremeno ili trajno onesposobe za rad i strah od zoonoza. U četvrtoj grupi stresora su kolegijalni odnosi, kolegijalna nesloga i nerazumevanje.

Istraživanja sprovedena u populaciji veterinara u Nemačkoj otkrivaju da su veterinari koji se bave kliničkom praksom u većoj meri skloni psihosocijalnom stresu i konzumiranju alkohola i lekova od veterinara zaposlenih u drugim videnjima veterinarske profesije. Veterinarke su više sklone konzumiranju alkohola

od svojih kolega veterinara, mada oni češće poseduju alkohol kod sebe (Harling i sar., 2009).

Smith i sar. (2009b) su proučavali vezu između muskuloskeletnih poremećaja i psihosocijalnih stresora kod veterinara. Ustanovili su da je u ispitivanom uzorku, samo u periodu od 12 meseci, 63% veterinara patilo od muskuloskeletnih poremećja u predelu nižih delova kičmenog stuba, 57% veterinara od muskuloskeletnih problema u predelu vratne kičme, 52% veterinara u predelu ramenog pojasa, a 34% veterinara u predelu gornjeg dela kičmenog stuba. Ovi istraživači su utvrdili statistički značajnu vezu između psihosocijalnih stresora i muskuloskeletnih poremećaja. Kao najznačajnije psihosocijalne stresore koji dovode do muskuloskeletnih poremećaja navode otežavajuće okolnosti pod kojima rade, nedostatak vremena za pružanje usluga svim klijentima i pacijentima, zahteve i očekivanja klijenata, loša reputacija veterinarske profesije u javnosti, nerazumevanje od strane kolega, porodice, roditelja i nedovoljno vremena za odmor.

Suicid je kod veterinara četiri puta češći nego u opštoj populaciji građana, a dva puta češći nego kod farmera, farmaceuta, lekara i zubara. Ova sklonost ka suicidu može da se objasni dostupnošću lekova, socijalnom i profesionalnom izolacijom, eutanazijom (kao jedinim mogućim rešenjem za pojedine neizlečive kliničke slučajeve kod životinje), rastom zahteva i očekivanja klijenata u odnosu na vreme i kvalitet pružanja veterinarskih usluga i finansijskim pritiskom (Bartram i Baldwin, 2008). Da je suicid čest kod veterinara i da je češći nego kod lekara i stomatologa potvrđila su i istraživanja uzroka smrti veterinara u Velikoj Britaniji (Mellanby, 2005; Platt i sar., 2010). Prema podacima koje iznosi Mellanby (2005), u periodu od 1979. do 1980. godine i u periodu od 1982. do 1990. godine, od 383 analizirana slučaja smrti veterinara, 35 slučajeva bilo je usled suicida, dok je od 30 analiziranih uzroka smrti veterinarki čak 7 bilo usled suicida. Od 4322 smrtna slučaja lekara, suicid je bio uzrok 141 slučaja, dok je od 699 lekarki 50 letalno skončalo usled suicida. Od ukupno 972 analizirana smrtna slučaja stomatologa, kod 38 uzrok smrti je bio suicid. U periodu od 1991. do 2000. godine suicid je bio uzrok smrti 26 od ukupno 295 umrlih veterinara, 6 od ukupno 36 umrlih veterinarki, 141 od ukupno 3419 umrlih lekara, 47 od ukupno 757 umrlih lekarki i 40 od ukupno 747 stomatologa (Mellanby, 2005). Pod posebnim rizikom od stresa i suicida su veterinari koji često obavljaju eutanaziju životinja kao što su veterinari koji rade u kliničkoj praksi sa kućnim ljubimcima, u hirurškim salama, sa oglednim životnjama i u prihvatištima za nezbrinute i napuštene životinje (Rohlf i Bennett, 2005). Utvrđeno je da profesionalni pristup eutanaziji životinja nije glavni razlog traumatskog stresa veterinara, već da su to pre socijalni činioci kao što je negativna kritika i loše vrednovanje rada veterinara koji obavljaju eutanaziju životinja, odnosno nerazumevanje građana za potrebu obavljanja eutanazije. Jedan od uzroka stresa, koji navode veterinari, predstavlja i strah od provala u veterinarske klinike i ambulante i krađa lekova kao i iskustva sa ovim situacijama (Phillips i sar., 2000). Anksioznost i depresija su česti poremećaji mentalnog zdravlja veterinara

(Bartram i sar., 2009; Fritsch i sar. 2009). Bartram i Baldwin (2010) su konstatovali da su kod veterinara sklonih suicidu moguće interakcije različitih predisponirajućih faktora kao što su: individualne karakteristike, prethodno stečena negativna iskustva vezana za praksu u toku studija veterinarske medicine, stresori vezani za samu praksu i radno mesto, odnosno kolegijalni odnosi, poznavanje i jednostavno dostupnost sredstava koja mogu da posluže samoubistvu i stid od mentalnih poremećaja. Prema podacima koje iznosi Mellanby (2005) u populaciji od 45445 samoubica muškog pola, u periodu od 1982. do 1996. godine, u Engleskoj i Velsu, 20% je izvršilo samoubistvo trovanjem čvrstim ili tečnim supstancama, 27% trovanjem gasovima i parom, 27% vešanjem, 6% davljenjem, 5% vatrenim oružjem, a 16% na neki drugi način. U istom periodu registrovano je 38 smrtnih slučajeva veterinara usled suicida, od čega se 76% ubilo trovanjem čvrstim ili tečnim supstancama, 3% gasovima i parom, 5% vešanjem i 16% vatrenim oružjem. U ukupnoj populaciji od 14082 samoubice ženskog pola, u istom vremenskom periodu, od 1982. do 1996. godine, u Engleskoj i Velsu, 46% žena se ubilo trovanjem čvrstim ili tečnim supstancama, 10% se otrovalo gasovima i parom, 17% vešanjem, 9% davljenjem i 19% na neki drugi način. U uzorku od 9 smrtnih slučajeva veterinarke, 89% se ubilo trovanjem čvrstim ili tečnim supstancama, a 11% gasovima i parom (Mellanby, 2005). Veterinari najčešće izvrše samoubistvo trovanjem ili vatrenim oružjem. U pojedinim studijama prikazano je da se čak 100% veterinara ubije trovanjem (Platt i sar., 2010). Zato je veterinarska profesija na prvom mestu po slučajevima samoubistava izvršenih trovanjem, posle koje sledi farmacija sa 61% slučajeva samoubistava među lekarima muškog pola izvršenih trovanjem čvrstim ili tečnim supstancama (Mellanby, 2005).

Maligna oboljenja veterinara / Malignant diseases of veterinarians

U toku svog radnog staža veterinari često dolaze u kontakt sa joničujućim zračenjem, anesteticima, pesticidima, a posebno insekticidima, odnosno antiektoparaziticima i onkogenim virusima (Kinlen, 1983; Olsen i sar., 1986; Fritsch, 2000; Truyen i Löchelt, 2006). Pored veterinara, posebno onih čija je uža specijalnost dermatologija, riziku od antiektoparazitika posebno su izložene osobe koje se bave održavanjem higijene dlake kućnih ljubimaca (Fritsch, 2000). Za maligna oboljenja kože rizik predstavlja i terenski rad veterinara zbog česte izloženosti sunčevim zracima (Travier i sar., 2003). Blair i Hayes (1980) su publikovali rezultate istraživanja uzroka smrti veterinara u SAD u periodu od 1966. do 1977. godine. Ustanovili su da su kod veterinara koji su bolovali od malignih bolesti najčešći uzrok smrti bile leukemije, Hodgkin limfom, kancer mozga i kože. Rezultate do kojih su došli su potvrdili nešto obimnijim istraživanjima, koja su publikovali dve godine kasnije (Blair i Hayes, 1982). Tada su izneli rezultate uzroka smrti veterinara umrlih u periodu od 1947. do 1977. godine. Maligna oboljenja limfatičnog i hematopoetičnog sistema, kolona, mozga i kože ponovo su se ispoljila

kao glavni uzrok smrti veterinara. Ovi istraživači su analizirali uzroke smrti 5016 veterinara. U periodu od 1947. do 1977. godine umrlo je 2846 (57%) veterinara koji su bili zaposleni u kliničkoj praksi i 2170 (43%) veterinara u drugim vidovima veterinarske delatnosti. U periodu od 30 godina, od 5016 veterinara, 47 je umrlo od zoonoza, 832 veterinara od malignih neoplazmi, 9 veterinara od benignih neoplazmi, 2526 veterinara od bolesti organa cirkulatornog sistema, 164 veterinara od respiratornih bolesti, 63 veterinara od ciroze jetre. Saobraćajni udesi su bili uzrok smrti za 158 veterinara, dok je suicid bio uzrok smrti za 137 veterinara. Od 832 veterinaru koji su umrli usled malignih neoplazmi 20 veterinara je boarlovalo od raka usne duplje i raka ždrela, 294 veterinara od raka ostalih organa digestivnog sistema, od kojih je čak 111 veterinara boarlovalo od raka kolona. Od raka pluća, bronhija i dušnika boarlovalo je 115 veterinara, a od raka prostate 106 umrlih veterinara. Od kancera limfatičnih i hematopoetičnih organa umrlo je 112 veterinara. Kod 1080 umrlih veterinara u periodu od 30 godina registrovani su drugi uzroci smrti, koje autori nisu precizirali (Blair i Hayes, 1982). Međutim, Kinlen (1983) je publikovao rezultate istraživanja uzroka smrti veterinara u Engleskoj i Velsu. Ovim istraživanjima je potvrđeno da je suicid jedan od značajnih uzroka smrti veterinara u Engleskoj i Velsu, ali je opovrgnuto mišljenje da veterinari često oboljevaju i umiru od malignih bolesti. Od 669 analiziranih uzroka smrti kod veterinara ispod 75 godina starosti, Kinlen (1983) je ustanovio da je 378 veterinara umrlo od cirkulatornih i cerebrovaskularnih bolesti, dok je 267 veterinara umrlo usled bolesti respiratornih organa (34 uzroka smrti), digestivnih organa (21 uzrok smrti), saobraćajnih udesa (53 uzroka smrti) ili drugih uzroka (51 slučaj). U ispitivanom uzorku od kancera su umrla 162 veterinara, od kojih najveći broj od raka pluća (56 smrtnih slučajeva) i želuca (16 smrtnih slučajeva). Istovremeno, Kinlen (1983) pojava i hipotezu da je ekspozicija veterinara onkogenim virusima glavni uzrok obolevanja i smrti usled malignih bolesti, kako su to prethodnim istraživanjima pokušali da dokažu američki istraživači (Blair i Hayes, 1980; 1982).

Miller i Beaumont (1995) su proučavali uzroke smrti veterinara u Kaliforniji umrlih u periodu od 1960. do 1992. godine. Ustanovili su da je značajan uzrok smrti suicid. Standardizovana proporcionalna smrtnost za maligni melanom kože veterinara iznosila je 3,47, za kancer debelog creva 1,74, za reumatsku bolest srca 3,50, a za suicid 2,50, dok je vrednost standardizovane proporcionalne smrtnosti od 5,89 ustanovljena kod veterinarskih slučajevima suicida. Kod veterinara koji su se veterinarskom profesijom bavili 20 i više godina, najčešći uzrok smrti bio je maligni melanom kože i reumatska bolest srca. Rak kolona kao uzrok smrti ustanovljen je kod veterinara sa radnim stažom dužim od 30 godina. Svec i sar. (2005) su doveli u vezu rizik od profesionalnog kontakta sa životnjama sa oboljevanjem od neoplazija limfohematopoetičnih organa. Dokazali su da su non-Hodgkin limfom, Hodgkin limfom, multipli mijelom i leukemije učestalije kod osoba čija je profesija vezana za direktni kontakt sa životnjama. Travier i sar. (2003) su u populaciji švedskih veterinara ustanovili povećan rizik od melanoma kože (relativni rizik (RR)=2,77), raka jednjaka (RR=3,78), kolona (RR= 2,36),

pankreasa (RR= 2,10) i mozga (RR= 2,51). Isti istraživači kao faktore rizika za maligna oboljenja veterinara navode upravo izloženost onkogenim virusima, sunčevom, ionizujućem zračenju i anesteticima.

Zaključak / Conclusion

Cilj ovog rada bio je da ukaže na najčešće povrede i zdravstvene poremećaje veterinara i da skrene pažnju na potencijalne faktore rizika za njihov nastanak. Stoga, nije neophodno iznositi zaključke u vidu rezimea svakog pogлављa ovog rada već je potrebno ukazati na neophodnost edukacije veterinara u oblasti bezbednosti na radu, na značaj poznавања i примене мера опреза и заштите на раду, на обавезу да пријаве уочене опасности и ризике на радном месту али и права да оdbiju rad u neodgovarajućim i nebezbednim uslovima. Кolegijalnost i razmena iskustava међу veterinарима у свим областима veterinarske profesije predstavljaju једну од најboljih мера које могу да додржесу boljoj radnoj bezbednosti veterinara i radu sa više zadovoljstva, a manje stresa, povreda i болести.

Literatura / References

1. Bartram DJ, Baldwin DS. Veterinary surgeons and suicide, influences, opportunities and research directions. *Vet Rec* 2008;162(2): 36-40.
2. Bartram DJ, Baldwin DS. Veterinary surgeons and suicide: a structured review of possible influences on increased risk. *Vet Rec* 2010; 166(13): 388-97.
3. Bartram DJ, Yadegarfar G, Baldwin DS. Psychosocial working conditions and work-related stressors among UK veterinary surgeons. *Occupational Medicine* 2009; 59(5): 334-41.
4. Blair A, Hayes HM. Cancer and other causes of death among U.S. veterinarians, 1966–1977. *Int J Cancer* 1980; 25(2): 181-5.
5. Blair A, Hayes HM. Mortality patterns among US veterinarians 1947–1977: an expanded study. *Int J Epidemiol* 1982; 11(4): 391-7.
6. Dembe AE, Erickson JB, Delbos RG, Banks SM. The impact of overtime and long work hours on occupational injuries and illnesses: new evidence from the United States. *Occup Environ Med* 2005; 62(9): 588-97.
7. Fairnie H. Occupational injury, disease and stress in Australian veterinarians: Qualitative and quantitative analysis of occupational injury, disease and stress in the veterinary profession. 1st ed. VDM Verlag Dr. Müller, 2010.
8. Fritschi L. Cancer in veterinarians. *Occup Environ Med* 2000; 57(5): 289-97.
9. Fritschi L, Day L, Shirangi A, Robertson I, Lucas M, Vizard A. Injury in Australian veterinarians. *Occup Med* 2006; 56(3): 199-203.
10. Fritschi L, Shirangi A, Robertson I, Day LM. Trends in exposure of veterinarians to physical and chemical hazards and use of protection practices. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2008; 81:371-78.
11. Fritschi L, Morrison D, Shirangi A, Day L. Psychological well-being of Australian veterinarians. *Aust Vet J* 2009; 87(3): 76-81.

12. Gabel CL, Gerberich SG. Risk Factors for Injury among Veterinarians. *Epidemiology* 2002; 13(1): 80-6.
13. Gardner DH, Hini D. Work-related stress in the veterinary profession in New Zealand. *New Zealand Vet J* 2006; 54(3): 119-24.
14. Harling M, Strehmel P, Schabion A, Nienhaus A. Psychosocial stress, demoralization and the consumption of tobacco, alcohol and medical drugs by veterinarians. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2009; 4(1): 4.
15. Jeyaretnam J, Jones H. Physical, chemical and biological hazards in veterinary practice. *Aust Vet J* 2000; 78(11): 751-8.
16. Kabuusu RM, Keku EO, Kiyini R, McCann TJ. Prevalence and patterns of self-reported animal-related injury among veterinarians in metropolitan Kampala. *J Vet Sci* 2010; 11(4): 363-5.
17. Kinlen LJ. Mortality among British veterinary surgeons. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 1983; 287(6398): 1017.
18. Leggat PA, Smith DR, Speare R. Exposure rate of needlestick and sharps injuries among Australian veterinarians. *Journal of occupational medicine and toxicology* 2009; 4(1): 25.
19. Lucas M, Day L, Fritschi L. Injuries to Australian veterinarians working with horses. *Vet Rec* 2009b; 164(7): 207-9.
20. Lucas M, Day L, Shirangi A, Fritschi L. Significant injuries in Australian veterinarians and use of safety precautions. *Occup Med* 2009a; 59(5): 327-33.
21. Mellanby RJ. Incidence of suicide in the veterinary profession in England and Wales. *Vet Rec* 2005; 157(14): 415-7.
22. Miller JM, Beaumont JJ. Suicide, cancer, and other causes of death among California veterinarians, 1960-1992. *American Journal of Industrial Medicine* 1995; 27(1): 37-49.
23. Mosedale PA. It shouldn't happen to a vet. *Occup Med* 2009; 59(5): 290-3.
24. Nienhaus A, Skudlik C, Seidler A. Work-related accidents and occupational diseases in veterinarians and their staff. *International archives of occupational and environmental health* (2005); 78(3): 230-8.
25. Nimbarde A, Aghazadeh F. Occupational injuries of veterinarians. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2004; 3(10): 707-16.
26. Olsen RG, Mathes LE, Tarr MJ, Blakeslee JR. Oncogenic viruses of domestic animals. *Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice* 2010; 40(6): 1189-200.
27. Phillips M, Jeyaretnam J, Jones H. Disease and injury among veterinarians. *Aust Vet J* 2000; 78(9): 625-9.
28. Platt B, Hawton K, Simkin S, Mellanby RJ. Systematic review of the prevalence of suicide in veterinary surgeons. *Occup Med* 2010; 60(6):436-46.
29. Reijula K, Rasanen K, Hamalainen M, Juntunen K, Lindbohm M, Taskinen H, Bergbom B, Rinta-Jouppi M. Work environment and occupational health of Finnish veterinarians. *American Journal of Industrial Medicine* 2003; 44(1):46-57.
30. Rohlf V, Bennett P: Perpetration-induced traumatic stress in persons who euthanize nonhuman animals in surgeries, animal shelters, and laboratories. *Society and Animals* 2005, 13(3):201-19.
31. Smith DR, Leggat PA, Speare R, Townley-Jones M, Examining the dimensions and correlates of workplace stress among Australian veterinarians, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2009a; 4(1):32.

32. Smith DR, Leggat PA, Speare R. Musculoskeletal disorders and psychosocial risk factors among veterinarians in Queensland, Australia. Aust Vet J 2009b; 87(7): 260-5.
33. Svec MA, Ward MH, Dosemeci M, Checkoway H, De Roos AJ. Risk of lymphatic or haematopoietic cancer mortality with occupational exposure to animals or the public. Occupational and Environmental Medicine 2005; 62(10): 726-35.
34. Travier N, Gridley G, Blair A, Dosemeci M, Boffetta P. Cancer incidence among male Swedish veterinarians and other workers of the veterinary industry: a record-linkage study. Cancer Causes and Control 2003; 14(6): 587-93.
35. Tryoen U, Löchelt M. Relevant Oncogenic Viruses in Veterinary Medicine: Original Pathogens and Animal Models for Human Disease. In: Dittmar T, Zaenker KS, Schmidt A, editors. Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis. Contributions to Microbiology. Basel, Karger, 2006; 13: 101-17.
36. Weese JS, Faires M. A survey of needle handling practices and needlestick injuries in veterinary technicians. Canadian Veterinary Journal 2009; 50(12): 1278-82.

ENGLISH

INJURIES AND NONINFECTIVE HEALTH DISORDERS OF VETERINARIANS

Marijana Vučinić

In professional and scientific journals there are many published results on different prevalence, patterns and risk factors of animal-related injuries and occupational disorders among veterinarians. Veterinary medicine is hazardous. Veterinarians work under uncomfortable and unsafe conditions not only in animal housing units but also in their clinics, stations and surgeries with wet and slippery floors. They work closely with animals. Veterinarians are a high-risk group for significant injury from animal contacts. Veterinarians perform procedures that cause the animal pain, distress, and protective reactions of animals in different forms, such as biting, kicking, scratching or other trauma from the animals. They are exposed to different risk materials, equipment and many other risk factors such as radiation, oncogenic viruses, sharp instruments, anaesthetics gases, pesticides (insecticides), long working hours and occupational stressors. Veterinarians work with unknown animals, unknown people and demanding clients. Veterinarian are not only at increased risk of occupational diseases and injuries but also at increased risk of death from work-related injuries, motor vehicle accidents, malignant diseases and suicide.

Key words: veterinarian, injuries, health disorders

РУССКИЙ

ПОВРЕЖДЕНИЯ И ЗДРАВООХРАНИТЕЛЬНЫЕ РАССТРОЙСТВА ВЕТЕРИНАРОВ НЕИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

Марияна Вучинич

В специальной и научной литературе находится достаточно публикованных результатов, относящиеся на различную частотность, вид и факторы риска

профессиональных повреждений и здравоохранительных расстройств ветеринаров. Ветеринарная деятельность рискованная. Ветеринары выполняют свою деятельность под неудобными и ненадёжными обстоятельствами не только в помещенных объектах для животных уже и в своих клиниках, амбулаториях и операционных залах влажных и скользких полов. Прибывают в самый близкий контакт с животными вследствие чего существует высокий риск, что их животные повредят. Ветеринары часто выполняют вмешательства, которые для животного больные и стрессогенные и которые у животных причиняют оборонительные реакции различных форм, как укусы, лягание, царапание и т.п. В своей работе, ветеринары подвергнуты влиянию различных материалов и оснащения и многим другим рискам, как ионизирующее излучение, онкогенные вирусы, острые инструменты, ингаляционные анестетики, пестициды (инсектициды), сверхурочная работа и профессиональные стрессоры. Ветеринары часто работают с незнакомыми животными, незнакомыми людьми и требовательными клиентами. Всё это причины из-за которых ветеринары не только подвергнуты увеличенному риску от профессиональных повреждений и болезней уже и увеличенному риску от смерти вследствие повреждений на работе, транспортных уделов, злокачественных заболеваний и самоубийств.

Ключевые слова: ветеринары, повреждения, здравоохранительные расстройства

**ULOGA VETERINARA U PREPOZNAVANJU I PREVENCIJI
SLUČAJEVA ZLOSTAVLJANJA ŽIVOTINJA***
**ROLE OF VETERINARIANS IN RECOGNITION AND PREVENTION
OF ANIMAL ABUSE**

Jelena Aleksić, S. Jović, Drinka Merćep**

Od donošenja Krivičnog zakona Republike Srbije 2005. godine, kao i Zakona o veterinarstvu, sve je veći broj slučajeva u našoj praksi koji se odnose na utvrđivanje dokaza za pokretanje krivičnog postupka zbog ubijanja životinja ili postupaka sa obeležjima različitih vidova zlostavljanja (mučenja) životinja. Nije mali broj slučajeva ni predmeta upućenih u cilju veštačenja radi utvrđivanja odgovornosti za isto krivično delo.

Zlostavljanje životinja je društvena pojava, koja podrazumeva širok spektar štetnog ponašanja čoveka prema životnjama, počev od nehotičnog zanemarivanja do namerne surovosti. Vidovi zlostavljanja su različiti i na osnovu Zakona o dobrobiti životinja obuhvataju fizičko i psihičko zlostavljanje.

Zlostavljanje i zanemarivanje životinja imaju veliki broj formi i širok spektar manifestacija, ali je krajnji rezultat uvek isti, a to je patnja životinja.

Veza između zlostavljanja životinja, nasilja u porodici i zlostavljanja dece nalaže širenje polja aktivnosti veterinara u prekidanju ovog ciklusa na podnošenje prijava slučajeva zlostavljanja životinja odgovarajućim službama, učešće u prevenciji, otkrivanju i pružanju pomoći javnim tužiocima u pokretanju krivičnog postupka protiv lica odgovornih za čin zlostavljanja i ubijanja životinja.

U ovom radu posebno je ukazano na funkciju veterinara u slučajevima sumnje na različite vidove zlostavljanja životinja, kao i na značaj njihove uloge u procesuiranju takvi predmeta.

Ključne reči: zlostavljanje životinja, prepoznavanje i prevencija zlostavljanja, uloga veterinara

* Rad primljen za štampu 07. 06. 2010. godine

** Mr sci. vet. med. Jelena Aleksić, asistent, mr sci. vet. med. Slavoljub Jović, asistent, mr sci. vet. med. Drinka Merćep, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Uvod / *Introduction*

Poslednjih godina sve je veći broj slučajeva upućenih veterinarima radi prikupljanja dokaza za pokretanje krivičnog postupka sa obeležjima različitih vidova zlostavljanja životinja ili u cilju veštačenja radi utvrđivanja odgovornosti počinioца za isto krivično delo. Sve veća učestalost takvih predmeta u praksi ukazuje na porast agresivnosti u našem društvu.

Definicije zlostavljanja su različite i variraju zavisno od vremena, mesta i društva. Na osnovu Zakona o dobrobiti životinja, zlostavljanje životinja se definše kao svako postupanje ili nepostupanje sa životinjama kojim se namerno ili iz nehata izazivaju bol, patnja, strah, stres, povreda, narušava genetska celovitost životinje i izaziva smrt (Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik 41/09). Zlostavljanje je socijalno neprihvatljivo ponašanje, koje podrazumeva širok spektar štetnog ophođenja čoveka prema životnjama, počev od nehotičnog zanemarivanja do namerne surovosti. Zlostavljanje i zanemarivanje životinja imaju veliki broj formi i širok spektar manifestacija, ali je krajnji rezultat uvek isti, a to je patnja životinja.

Vrste zlostavljanja / *Types of animal abuse*

Vidovi zlostavljanja su različiti i na osnovu Zakona o dobrobiti životinja obuhvataju fizičko i psihičko zlostavljanje (Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik 41/09).

Fizičko zlostavljanje (neakcidentalne povrede, NAI) podrazumeva namerno nanošenje povreda ili nepotrebnog bola, uključujući neodgovarajuće načine i metode treninga (Olson, 1998).

Na osnovu Zakona o dobrobiti životinja, fizičko zlostavljanje definisano je kao akt kojim se narušava fizička celovitost oštećenjem tkiva i organa, kao što je: batinjanje, šutiranje, bičevanje, seksualno nasilje, prisiljavanje na rad ili obuku, koji prevazilaze izdržljivost životinje, neodgovarajući načini hvatanja i obuzdavanja, sprovođenje intervencija na životnjama suprotno odredbama ovog zakona i svesno reproducovanje jedinki koje pate od naslednih bolesti, ako se ono ne vrši u ogledne svrhe u skladu sa zakonom (Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik 41/09).

Bilo koji seksualni kontakt sa životnjama, koji može, a ne mora da rezultira fizičkim povređivanjem životinje smatra se seksualnim zlostavljanjem (Vučinić, 2006). U slučajevima seksualnog zlostavljanja kod životinja se mogu naći povrede na polnim organima, rektumu ili anusu, što najčešće podrazumeva razderotine ovih organa (Munro i Thrusfield, 2001a; Munro i Thrusfield, 2001b).

Psihičko (emotivno) zlostavljanje je ponavljano ili stalno mentalno nasilje, uključujući sprečavanje uspostavljanja socijalne interakcije sa drugim životnjama. Emotivno zlostavljenje životinje mogu da ispolje slične znake kao emotivno zlostavljeni deca, koji se ogledaju u plašljivom ponašanju u prisustvu

vlasnika, napadima panike, ekstremnoj pasivnosti ili agresivnosti životinje (Anon, 2003).

Zakon o dobropiti životinja psihičko zlostavljanje definiše kao zlostavljanje kojim se narušava psihička celovitost jedinke i koje može izazvati ili izaziva poremećaje u ponašanju. Ogleda se u onemogućavanju životinji da zadovolji svoje osnovne potrebe u ponašanju, da iskoristi prostor za odmor i zaklon, razjarivanju životinje primenom fizičke sile, drugim životnjama ili nadražajima koji joj nisu svojstveni, nanošenju straha, patnje i prouzrokovanim osećajima dosade i nesigurnosti, kao i sprečavanju životinja da uspostave socijalnu vezu sa životnjama iste vrste (Zakon o dobropiti životinja, Sl. glasnik 41/09).

Zanemarivanje je čin neobezbeđivanja odgovarajuće količine i kvaliteta hrane i vode, skloništa i veterinarske nege, što za posledicu ima loše fizičko i zdravstveno stanje životinje. Znaci zanemarivanja su izražena pothranjenost, mršavost ili kaheksija, vidljive koštane strukture, obilan iscedak iz očiju ili nosa, povrede od okovratnika utisnutog u kožu vrata, prerastanje kandži, hronične, netretirane ili loše zarasle rane i lezije po koži, rane i dlačni pokrivač infestirani različitim razvojnim stadijumima insekata, buvama, krpeljima ili drugim ektoparazitima, prekomerno nakupljanje fekalne mase i ulepljena dlaka, zamršen i neuredan dlačni pokrivač u predelu anusa i distalnih delova ekstremiteta. Zanemarivane životinje su obično i u veoma lošoj fizičkoj kondiciji (Vučinić, 2006).

U našoj zemlji, na osnovu analize podataka, najčešće je prisutno fizičko zlostavljanje (52%), zanemarivanje (32%), psihičko zlostavljanje (13%), pojava hordašenja (2%) i seksualno zlostavljanje životinja (1%) (Stanković, 2007).

Na značaj i važnost ove pojave u društvu ukazuje veliki broj radova i naučno potkrepljenih činjenica da je tanka nit između čina zlostavljanja životinja i zlostavljanja ljudi (Arkow, 1992; Lockwood i Ascione 1998; Ascione i Arkow, 1999).

Istorija zlostavljanja životinja često je pokazatelj aktuelnog, ali i budućeg nasilja nad ljudima, koje je posebno izraženo prema članovima porodice (supruga, deca i starije osobe). Ova veza ukazuje na to da je nasilje nad životinjama problem koji ne samo da utiče na životinje, već predstavlja opasnost i za društvo u celini. Istraživači takođe povezuju istoriju zlostavljanja životinja sa budućim serijskim ubicama i porastom ubistava od strane adolescenata u školama. Albert DeSalvo (Bostonski davitelj), Theodore Bundy, David Berkowitz (Sermov sin) i dr. su ozloglašene ubice sa biografijom zlostavljanja i ubijanja životinja u detinjstvu. Procenjeno je da je 88 % kućnih ljubimaca zlostavljan ili ubijeno u porodicama u kojima je zabeleženo nasilje među njihovim članovima. Od svih žena u Americi koje su otišle u „sigurne kuće“, da bi izbegle zlostavljanje, 57% je imalo kućnog ljubimca koji je ubijen od strane lica koje je i njih zlostavljalo (Ascione, 1999).

Zlostavljanje životinja je socijalno neprihvatljivo ponašanje koje izaziva bol, patnju, stres, a u nekim slučajevim i smrt životinje i tretira se kao krivično

delo, kroz čije se sankcionisanje štite vrednosti savremenog i demokratskog društva (Stanković, 2007).

Veza između zlostavljanja životinja, nasilja u porodici i zlostavljanja dece ukazuje na činjenicu da veterinari imaju značajnu ulogu u društvenoj zajednici. Njihova uloga ogleda se u prepoznavanju, prevenciji, istraživanju i pokretanju krivičnog postupka protiv lica odgovornih za čin zlostavljanja. Takođe, veterinari imaju i etičku ulogu u očuvanju zdravlja, sigurnosti i dobrobiti životinja i javnog zdravlja. U tom smislu imaju važnu ulogu u sprečavanju nasilja u porodici, prepoznavanjem zlostavljanja životinja i podnošenjem prijava takvih slučajeva odgovarajućim službama.

Znaci koji ukazuju veterinarima na zlostavljanje životinja / Signs that indicate abuse of animals

Prepoznavanje različitih vidova zlostavljanja nije u svim slučajevima jednostavno i lako, jer životinje mogu da pokažu bojažljivost i uplašenost i iz drugih razloga, tj. da uzrok takvog oblika ponašanja nije zlostavljanje.

Sumnja na slučaj zlostavljanja zasniva se na većem broju elemenata, kao što su istorija bolesti, ponašanje vlasnika ili drugih članova porodice, kao i na prisustvu određenih vrsta povreda na telu životinje.

Ne postoji objektivan dijagnostički test kada se radi o zlostavljanju životinja i u tom slučaju veterinar treba da se osloni na svoje znanje, iskustvo, profesionalno mišljenje i intuiciju (Olfert i sar., 1998).

Najbolji način da se utvrdi da li je neka životinja zlostavljana ili nije, jesu klinički pregled životinje i pregled njenog životnog okruženja (habitata).

Prilikom pregleda, stručno lice prvo treba da ustanovi da li se radi o akcidentalnim (slučajnim) ili neakcidentalnim (namernim) povredama. Kritrijumi za procenu eventualnog zlostavljanja na osnovu kojih je moguće razlikovati slučajne od namernih i sa predviđajem naneti povreda su: istorija bolesti koja ne odgovara ustanovljenim promenama na telu životinje, nedostatak brige vlasnika zbog povreda na životinji, odlaganje pružanja pomoći životinji od strane stručnog lica (veterinara), postojanje promena u ponašanju životinje (strah u prisustvu vlasnika, depresija), kao i neodgovarajuća telesna građa i stanje uhranjenosti životinje. Posebno je značano postojanje svežih, starih, zaleženih ili netretiranih rana, brojnih frakturna u različitim fazama zarastanja, podliva, opeketina, razderotina, ubodnih rana, otkinutih kandži, nalaz konjunktivalnih krvavljenja, krvavljenja iz nosa, nalaz hematoma, hemoragija retine, fraktura, oštećenja ligamenata, povreda kičme udruženih sa neurološkim smetnjama i disfunkcijom, ruptura diafragme, povrede moždanog tkiva i paraplegija (Munro i Thrusfield, 2001a; Smith i Walter, 1985; Munro i Thrusfield, 2001b).

U slučajevima sumnje na zlostavljanje životinja u razmatranje treba uzeti i ponašanje vlasnika, koje može biti napadno, neuverljivo ili bez objašnjenja za prisutne povrede po telu životinje, nezainteresovanost za njeno stanje i opis

kao zločudne (Anon, 2003). Takođe nam na slučajeve zlostavljanja životinja mogu ukazati i uslovi smeštaja, nege i brige o životnjama (životinje koje su u dužem vremenskom periodu držane vezane bez dovoljne količine hrane, vode, u nepovoljnim vremenskim prilikama, bez mogućnosti pristupa skloništu, vezane na higijenski neprihvatljivim mestima, na kojima usled prisustva različitog otpada mogu da se povrede i inficiraju, kao i ukoliko se drže u štenarama ili kavezima sa velikim brojem životinja na malom prostoru, koji im onemogućava normalno kretanje).

U slučajevima zlostavljanja razlikujemo makro i mikro pristup. Makro pristup podrazumeva usredsređivanje na habitat u kome životinja boravi, a zatim i na samu jedinku (habitus). Mikro pristup podrazumeva sakupljanje dokazanog materijala i primenu specijalnih i specifičnih metoda u cilju njihove analize (PCR, forenzička entomologija, botanika, polinologija i dr.).

Pažnja se usredsređuje na smeštaj životinje (da li postoji, da li je zaštićen od kiše, vode, vlage i zaklonjen od vetra, da li ima dovoljno vazduha, da li se nalazi na terenu koji je kao deponija – slomljeno staklo, zardale žice, iznutrice), kakvo je stanje zemljišta na kome je objekat (blato doprinosi infekciji šapa i ekstremiteta), stanje podloge u objektu (čvrsta i suva – napor za jedinke sa artritisom i fragilnim koštanim skeletom, da li je prekrivena otpadom životinjskog porekla). Potom se nastavlja procena dostupnosti i kvaliteta izvora hrane i vode (da li je hrana dostupna u dovoljnoj količini za sve životinje, njen kvalitet, da li je čista, slobodna od buđi i kontaminacije od strane pacova).

Sledeći korak je usredsređivanje pažnje na stanje životinje u momentu pregleda. Pažljivim posmatranjem prvo treba da se ustanovi ponašanje životinje (ravnodušna, pokunjena, nervozna, agresivna – usled gladovanja ili postojanja nekog patološkog procesa) (Anon, 2003).

Pažnju treba obratiti i na kondiciju jedinke (ugojena, mršava), da li hrailje prilikom kretanja ili je kretanje normalno.

U daljem toku pregleda, veterinari treba da se fokusiraju na zdravstveni status jedinke detaljnijom analizom fizičkog/kondicionog stanja i pregledom telesnih otvora. Treba da ustanove da li je prisutan iscedak iz očiju, slepilo, konjunktivitis, da li u ušnim školjkama postoji zapaljeni proces (otitis, pruritus ili hematomi). Pregleda se i stanje usne duplje i zubala – prekomerno nakupljen zubni kamenac, intenzivan i neprijatan miris, nedostatak zuba, prisustvo abscesa u usnoj duplji-otok bukalne sluznice i gingiva, boja sluzokože – bleda (anemična životinja), ružičasta (zdrava životinja), ili hiperemična. U obzir treba uzeti i stanje dlačnog pokrivača (neuredno, zamršeno krvno, prisustvo buva i krpelja), što može da ukaže na bolest, malnutriciju, ili hormonski disbalans. Ocenuje se stanje šapa, ekstremiteta (prerasli, dugački nokti, koji urastaju u jastučiće izazivaju infekciju i bol) i reproduktivni status životinje (jalova, sterilisana, kastrirana, pokazuje znake estrusa, podaci o partusu, laktaciji).

Veterinar treba da dâ ocenu u pogledu uzroka ustanovljenih rana i povreda na telu životinje i da izvrši procenu njihove starosti, kao i da konstatiše da li su u rani prisutni razvojni stadijumi muva, kao jedan od znakova zanemarivanja.

Finalni korak obuhvata procenu unutrašnjeg stanja organizma jedinke. Vlažan hronični kašalj može da ukaže na oboljenja srca i kardiovaskularnog sistema. Usled gubitka telesne mase može se posumnjati na prisustvo ektoparazita i tada treba uzeti uzorak fecesa za analizu. Ne nalaženje jaja parazita ne isključuje postojanje unutrašnjih parazitoza, tzv. okultni parazitizam, kada su crvi ili protozoe (kokcidije) prisutni, ali ne ležu jaja. U slučaju koprološkog nalaza najčešći intestinalni paraziti su valjkasti crvi i pantljičare.

U slučaju uginuća često je neophodno izvršiti obdukciju tela životinje da bi se utvrdilo da li se radi o posledici zlostavljanja, zanemarivanje i izglađivanja životinje, ili su do uginuća doveli neki drugi uzroci. Neophodno je na objektivan način dokumentovati sve vrste mehaničkih povreda: krvni podlivi, oguljotine, različite vrste rana – posekotine (*vulnus incisum*), razderotine (*vulnus lacerocutatum*), ubodne rane (*vulnus punctum*), ustreljine (*vulnus slopetarium*), povrede nastale kao posledica penetracije ili interspecijske agresije. Treba dokumentovati i povrede unutrašnjih organa (fotodokumentacija, radiografija). Neophodna je radiografija celog tela, usled mogućeg nalaza zaleženih fraktura, kao i procesa u zaleženju, što ukazuje na istoriju ponavljane traume.

Utvrđivanje vremena uginuća bazira se na proceni vremena potrebnog za razvoj određenih postmortalnih promena, stepena pražnjenja želuca i creva i eventualno forenzičkoj entomologiji (Anderson i Huitson, 2004). Od veterinara može da se zahteva davanje stručnog mišljenja i u slučajevima kada su leševi stari i kada je od akcidenta prošao dug vremenski period. U takvim slučajevima za davanje stručnog mišljenja su važni dokazi sa mesta zlostavljanja životinje, površine i unutrašnjosti tela životinje (Melinda, 2007).

Uloga veterinara u krivičnim predmetima zlostavljanja životinja / Role of veterinarians in criminal cases of animal abuse

Uspešna istraga, optužni predlog i sudski spor zahtevaju precizno prikupljene dokaze, njihovo tumačenje, obradu i prezentovanje na суду. Ovako temeljan pristup je odlučujući za ishod sudskog spora, krivičnog gonjenja, odnosno za kažnjavanje počinioца izvršenog krivičnog dela. To može da bude odlučujuće i da utiče na kvalitet suđenja i veštačenja (predmet može da bude odbačen zbog nedostatka dokaza ili neadekvatno prikupljenih dokaza). Sistematskim pristupom prikupljanju svih činjenica povećava se i mogućnost saznanja o relevantnim dokazima, čime se stvaraju uslovi za uspešan ishod sudskog procesa i kažnjavanje prestupnika.

U Republici Srbiji je u Krivični zakon koji je stupio na snagu 1. januara 2006. godine uveden član 269. koji se odnosi na sankcije u slučaju ubijanja i zlostavljanja životinja. U stavu 1. člana 269. Krivičnog zakonika стоји да ће se kazniti novčanom kaznom ili zatvorom do jedne godine ko kršeći propise ubije, povredi, muči ili na drugi način zlostavlja životinju, a u stavu 2. ovog člana da ukoliko je došlo do ubijanja, mučenja ili povređivanja većeg broja životinja ili je delo

učinjeno u odnosu na životinju koja pripada posebno zaštićenim životinjskim vrstama, učinilac će se kazniti novčanom kaznom ili zatvorom do 3 godine (Krivični zakonik, 2005).

Za ovo krivično delo goni se po službenoj dužnosti, što podrazumeva obavezu preduzimanja službenih radnji od strane nadležnih organa po priјemu obaveštenja o izvršenom krivičnom delu, a potom i naredne faze postupka. Činjenica da se delo zakonski reguliše, ukazuje i na zainteresovanost države da se suzbije ova vrsta nedozvoljenog ponašanja i spreči buduće protivpravno postupanje.

Svi građani, državni organi, organi teritorijalne autonomije ili organi lokalne samouprave, javna preduzeća i ustanove, dužni su da prijave krivična dela za koja se goni po službenoj dužnosti, o kojima su obavešteni.

Zakon o dobrobiti životinja obavezuje svakog građanina Republike Srbije da spreči i prijavi sve oblike zlostavljanja životinja i ugrožavanja njihovog života, zdravlja i dobrobiti, ministarstvu nadležnom za poslove veterinarstva ili ministarstvu nadležnom za unutrašnje poslove (Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik 41/09).

Veterinari, udruženja za zaštitu životinja i centri za socijalni rad deo su stručne javnosti koji je posebno zainteresovan za iniciranje i vođenje krivičnog postupka zbog izvršenja krivičnog dela ubijanja i mučenja životinja. Bez obzira kome je prijava podneta, ovi organi su obavezni da reaguju u vezi sa njom, jer je reč o delu za koje se goni po službenoj dužnosti (Stanković, 2007).

Najznačajnija uloga veterinara u slučajevima zlostavljanja i ubijanja životinja je pisanje nalaza i mišljenja na savestan i stručan način. Ovaj akt istovremeno predstavlja javnu ispravu i osnov za procesuiranje predmeta. Klinički nalaz treba da sadrži stanje životinje sa detaljnim opisom svih promena i nanetih povreda ili, kada je u pitanju leš, stručno i profesionalno napisan obduktioni nalaz.

U slučajevima postojanja obeležja dela iz člana 269. KZ RS Program mera zdravstvene zaštite životinja za 2010. godinu obavezuje veterinare da u slučaju postojanja sumnje da je životinja mučena, odnosno ubijena protivno propisima, procene stepen ugroženosti dobrobiti životinja, odnosno utvrde uzrok uginuća (Pravilnik o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2010. godinu, Sl. glasnik 6/10). Tokom ovog postupka utvrđuje se identitet žrtve, ukazuje na mere koje su mogле da budu preduzete, a nisu u cilju prevencije obolenja, nastanka povreda ili uginuća. Dalje, utvrđuje se uzrok koji je doveo do uginuća, iznosi redosled kojim su nanošene ustanovljene povrede na telu životinje, procenjuje se njihova starost i daje mišljenje o brzini nastanka egzitusa i stepena patnje kom je životinja bila izložena.

Sve navedeno pokazuje koliko je važno da veterinari prilikom svog svakodnevnog rada na terenu prepoznaju znake zlostavljanja i da slučaj prijave nadležnim službama.

Zaključak / Conclusion

Prepoznavanje i prijavljivanje slučajeva zlostavljanja životinja je važno ne samo iz razloga što su veterinari odgovorni za njihovu dobrobit, već i zbog veze koja postoji između zlostavljanja životinja i nasilja nad ljudima (Cattaneo, 2006).

Zlostavljenim životnjama neophodna je nega i pažnja, zbog nanetih fizičkih povreda i negativnih emotivnih iskustava stečenih zlostavljanjem (strahovi i stanja slična strahu – anksioznost, fobije, panika, patnja kao stanje krajnje emocionalne iscrpljenosti).

Veterinari imaju moralnu obavezu da brinu o dobrobiti životinja, što podrazumeva njihovo fizičko, ali i psihičko zdravlje. U tom cilju treba da preuzmu vodeći ulogu u obazovanju vlasnika, odnosno držaoca životinja. zajedno sa policijom i drugim državnim organima prepoznavanjem i prevencijom slučajeva zlostavljanja životinja pomažu ne samo životnjama, već i društu u celini (Arkow, 1994). Na taj način se šalje poruka počiniocu da njegovo postupanje nije dozvoljeno i da je država aktivna na njegovom sprečavanju (Stanković, 2007).

Literatura / References

1. Anderson GS, Huitson NR. Myasis in pet animals in British Columbia: The potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect. CVJ 2004; 45(12): 993-8.
2. Anon. Recognizing Child Abuse: What Parents Should Know. Prevent Child Abuse America, 2003.
3. Arkow P. The correlations between cruelty to animals and child abuse and the implications for veterinary medicine. Can Vet J 1992; 33: 518-21.
4. Arkow P. Child Abuse, animal abuse and the veterinarian. J Am Vet Med Assoc 1994; 204(7): 1004-7.
5. Ascione FR. Child Abuse, Domestic violence and animal abuse: linking the circles of compassion for prevention and intervention, 1999.
6. Ascione FR, Arkow P eds. Child Abuse, Domestic Violence and Animal Abuse: Linking the Circles of Compassion for Prevention and Intervention. West Lafayette, Indiana: Purdue Univ Pr, 1999. DM (eds.) Textbook of small animal orthopaedics, 1985.
7. Cattaneo C, Marinelli E, Di Giancamillo A, Di Giancamillo M, Travetti O, Vigano L, Poppa P, Porta D, Gentilomo A, Grandi M. Sensitivity of autopsy and radiological examination in detecting bone fractures in an animal model: Implications for the assessment of fatal child physical abuse. Forensic Science International 2006; 164: 131-7.
8. Krivični zakonik, Sl. glasnik, 85/05.
9. Lockwood R, Ascione FR eds. Animal Cruelty and Interpersonal Violence: Readings in Research and Application. West Lafayette, Indiana: Purdue Univ Pr, 1998.
10. Melinda DM. The Veterinarians Role in Handling Animal Abuse Cases: Veterinary Forensics: Making the Case-Proving Cruelty Through Forensics, 2007.
11. Munro HMC, Thrusfield MV. "Battered pets": features that raise suspicion of nonaccidental injury: J Sm Ani Prac 2001a; 42: 218-26.

12. Munro HMC, Thrusfield MV. "Battered pets": non-accidental physical injuries found in dogs and cats.: J Sm Ani Prac 2001b; 42: 279-90.
13. Olfert ED, Rothwell BWR (Byrnne), Harasen GLG. Providing Veterinary Expertise in an Animal Welfare Case, or What the SPCA Inspector Wants When They Call a Veterinarian. SVMA Newsletter 1998; 31:2.
14. Olson P. Recognizing and Reporting Animal Abuse - A Veterinarian's Guide. Denver, CO. American Humane Association, 1998: 82
15. Pravilnik o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2010. godinu, Sl. glasnik 6/10.
16. Smith GK, Walter MC. Fractures and luxations of the spine. In Newton CD & Nunemaker, 1985.
17. Stanković A. Ubijanje i mučenje životinja. Krivično delo u Srbiji. ORCA, 2007: 122.
18. Vučinić M. Zoofilija, bestijalnost, zooseksualnost i zaštita životinja. U: Ponašanje, dobrobit i zaštita životinja, VKS, 2006: 364-6.
19. Zakon o dobrobiti životinja, Sl. glasnik 41/09.

ENGLISH

ROLE OF VETERINARIANS IN RECOGNITION AND PREVENTION OF ANIMAL ABUSE

Jelena Aleksić, S. Jović, Drinka Merćep

Since the Criminal law of the Republic of Serbia in 2005 as well as the Law on veterinary medicine, there has been an increasing number of cases that deal with raising criminal charges due to animal killing or torturing. There is also a significant number of forensic cases that are aimed at discovering criminal acts.

Animal abuse is a social issue, which includes a range of behaviours of humans that are harmful to animals, starting from unintentional neglect to intentional cruelty. Types of animal abuse are different and they can include physical, sexual, emotional abuse, or neglect. Abuse and neglect of animals have a variety of forms and manifestations, but the end result is always the same - animal suffering.

The connection between animal abuse, domestic violence, and child abuse indicates that there is a significant role of veterinarians in social contexts and in terms of stopping this vicious cycle by preventing, discovering and turning in suspects involved in these crimes. The help that veterinarians provide to public prosecutors is of great importance.

This study shows the role of veterinarians in cases of possible animal abuse, as well as their role in processing that type of cases.

Key words: animal abuse, recognition and prevention of animal abuse, role of veterinarian

РУССКИЙ

РОЛЬ ВЕТЕРИНАРОВ В УЗНАВАНИИ И ПРЕВЕНЦИИ СЛУЧАЕВ ИСТЯЗАНИЯ ЖИВОТНЫХ

Елена Алексич, С. Йович, Дринка Мерчеп

От приношения Уголовного кодекса Республики Сербии 2005 года, словно и Закона о ветеринарии, всё большое число случаев в нашей практике, относимые на утверждение доказательств для возбуждения уголовного дела из-за убийства животных, или поступков с знаками различных видов истязания (мучения) животных. Не маленькое число случаев ни предметов, направленных с целью проведения экспертизы ради утверждения ответственности для того же уголовного преступления.

Истязание животных общественное явление, подразумевающее широкий спектр вредного поведения человека к животным, начав от невольного забрасывания до преднамеренной суровости. Виды истязания различные и на основе Закона о благосостоянии животных охватывают физическое и психическое истязание.

Истязание и оставление без внимания животных имеют большое число форм и широкий спектр манифестаций, но крайний результат всегда тот же, а это страдание животных.

Связь среди истязания животных, насилия в семье и истязания детей указывает на факт, что ветеринары имеют значительную роль в общественном объединении в прерывании этого цикла, узнаванием случаев истязания животных и подавлением заявлений таких случаев соответствующим службам. Их участие в превенции, открывании и оказывании помощи общественным обвинителям в возбуждении уголовного дела против лиц, ответственных за поступок истязания животных, но и убийство необходное.

В этой работе отдельно указано на функцию ветеринаров в случаях сомнения на различные виды истязания животных, словно и на значение их роли в процессуировании таких предметов.

Ключевые слова: истязание животных, узнавание и превенция истязания, роль ветеринаров

RADIOAKTIVNOST FOSFATNIH MINERALNIH PROIZVODA^{*} RADIOACTIVITY OF PHOSPHATE MINERAL PRODUCTS

Branislava Mitrović, Gordana Vitorović, Mirjana Stojanović, D. Vitorović^{**}

Fosfatna industrija predstavlja jedan od najvećih zagađivača životne sredine uranijumom. Preradom fosforne rude dobija se veliki broj različitih proizvoda, od kojih su posebno značajni fosfatna mineralna đubriva i fosfatni mineralni dodaci (di- i monokalcijum fosfat). Fosfatni mineralni dodaci koji se koriste u smešama za ishranu životinja mogu sadržati visoke aktivnosti uranijuma. Istraživanja u ovom radu treba da pruže odgovor u kojoj meri fosfatni mineralni proizvodi (fosfatna đubriva i fosfatni mineralni dodaci stočnoj hrani) doprinose kontaminaciji zemljišta, biljaka i životinja.

Ključne reči: fosfatni mineralni proizvodi, životna sredine, uranijum, stočna hrana

Uvod / Introduction

Sva živa bića na Zemlji izložena su dejstvu jonizujućeg zračenja. Nivo prirodne radioaktivnosti na Zemlji zavisi od: sadržaja prirodnih radioaktivnih elemenata u biosferi, od vrste kosmičkog zračenja, geoloških karakteristika zemljišta, nadmorske visine kao i od geografske širine i dužine. Zato se i nivo prirodne radioaktivnosti razlikuje širom zemaljske kugle, od mesta do mesta. Tehnološki uslovljena povišena prirodna radioaktivnost (technologically exchanged natural radioactivity) je pojam relativno novijeg datuma. Uveden je polovinom sedamdesetih godina i označava izlaganje prirodnim izvorima zračenja koja se ne bi pojavila bez prethodne tehnološke aktivnosti. Proizvodnjom fosfatnih mineralnih proizvoda iz fosfornih ruda, apatita i fosforita, preko 90 % uranijuma ostaje u finalnim proizvodima. Na osnovu podataka da se u svetu godišnje prerađuje oko 135 miliona tona fosfornih ruda, procenjuje se da se godišnje može očekivati unos od 21.000 t uranijuma u životnu sredinu, što predstavlja oko 73% od ukupnog unosa

* Rad primljen za štampu 01. 11. 2010. godine

** Mr sci. vet. med. Branislava Mitrović, asistent, dr sci. vet. med. Gordana Vitorović, profesor, Katedra za radiologiju i radijaciju higijenu, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. Mirjana Stojanović, ITNMS-Beograd; dr sci. Duško Vitorović, profesor, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

(Dangić, 1995). Ovakvi unosi uranijuma u životnu sredinu mogu predstavljati značajne lokalne rizike izlaganja stanovništva ionizujućem zračenju, ali i dovesti do povećanja nivoa osnovnog zračenja (FON) u određenim regionima. Iako su životna sredina i sve biološke zajednice u njoj oduvek bili izloženi prirodno radioaktivnom zračenju, postavlja se pitanje da li se biološke zajednice prilagođavaju proizvedenim radioaktivnim supstancama koje je čovek uneo u životnu sredinu svojom delatnošću.

Cilj ovog rada je da se istakne značaj monitoringa kao i kontrole prozvodnje i upotrebe fosfatnih mineralnih proizvoda, u cilju sprečavanja uključenja uranijuma u lanac ishrane (zemljište – biljke – životinje – čovek).

Prisutnost uranijuma u životnoj sredini / Uranium in environment

^{238}U je rodonačelnik porodice urana (uranovog niza), sa vremenom poluraspada od 4.47×10^9 godina. Prirodni uranijum se smatra slabo radioaktivnim elementom, ali hemijski toksičnim, jer se radi o teškom metalu.

U životnoj sredini uranijum je normalno prisutan u zemljištu, stenama i vodi. Prirodni sadržaj uranijuma u vulkanskim stenama kreće se 0,1-5 mg/kg (ppm), u sedimentnim stenama 0,5-4 mg/kg, a u fosfatnim stenama 30-300 mg/kg. U zemljištima je uranijum prisutan u obliku oksida, a sadržaj uranijuma kreće se u opsegu 1-4 mg/kg i različit je u pojedinim delovima sveta.

Jedinjenja uranijuma pripadaju sledećim oksidacionim stanjima: +3, +4, +5 i +6, pri čemu oksidaciono trovalentno i petovalentno stanje (+3 i +5) nije stabilno. Ciklus uranijuma u prirodi obuhvata litosferu i hidrosferu. Osnovni faktori koji utiču na kretanje uranijuma kroz litosferu su redoks potencijal i kiselost sredine. Oksidacijom četvorovalentnog uranijuma započinje kretanja uranijuma u prirodi. Sve dok su kompleksi uranijuma u vodenoj fazi stabilni, odvija se proces širenja uranijuma kroz prirodu. Proces kontaminacije zemljišta uranijumom se prekida kada se uranijum redukuje ili fiksira. Međutim, sa izmenom uslova u prirodi, fiksiran uranijum se može ponovo pokrenuti i tako ciklus ponovo otpočinje (Veselinović i sar., 1995).

Fosfatni proizvodi kao antropogeni izvor uranijuma / Phosphatic products as anthropogenic source of uranium

Uranijum koji se uneše u životnu sredinu iz antropogenih izvora, učestvuje u geohemijskim procesima na isti način kao i elementi iz prirodnih izvora. Treba naznačiti da se uranijum koji se u zemljištu pojavljuje iz geohemijskih izvora nalazi u manje pristupačnim ili sasvim nepristupačnim oblicima, dok je uranijum koji u zemljište dospeva iz antropogenih izvora najčešće u takvim oblicima da je njegova pristupačnost za biljke veća. Jedna od najznačajnijih nenuklearnih industrija kojom se radionuklidi unose u životnu sredinu je fosfatna industrija, sa finalnim proizvodima koji imaju sve veću primenu. Smatra se da je radioaktivna

opasnost koja nastaje u procesima proizvodnje fosfata približna opasnosti koja postoji u rudnicima uranijuma (Stojanović i sar., 2006). Primena veštačkih fosfatnih đubriva predstavlja daleko najveći antropogeni izvor unošenja urana i pratećih radionuklida (Ra i Th) u životnu sredinu (Šatalov i Laskorin, 1989). Osim procena koliko će se uranijuma uneti u zemljišta tretirana fosfornim đubrivima, nema mnogo literaturnih podataka o sudbini tako unetog uranijuma u zemljište.

Proizvodnja fosfornih đubriva se zasniva na rastvaranju prirodnih fosfata sumpornom kiselinom, pri čemu u prvoj fazi nastaje fosforna kiselina, koja dalje rastvara prirodne fosfate gradeći kao krajnji produkt fosforna đubriva. Rastvaranjem afričkih prirodnih fosfata sumpornom kiselinom, 90-95% uranijuma prisutnog u fosfatima prelazi u fosfornu kiselinu, da bi se kao krajnji produkt deponovao u fosfornim đubrivima. Objašnjenje ove pojave leži u činjenici da je uranijum u afričkim fosfatima dominatan u šestovalentnom obliku, za razliku od američkih fosfata, gde se uranijum nalazi dominantno u četvorovalentnom obliku i čijom preradom 60-80 % uranijuma pređe u fosfornu kiselinu. Deponovan uranijum u superfosfatu je u obliku uranilsulfata $\text{UO}_2(\text{SO}_4)$ i uranosulfata $\text{U}(\text{SO}_4)_2$, oba rastvorljiva u vodi (Rothbaun i sar., 1979).

Preradom fosfornih ruda dobijaju se i mono- i dikalcijum fosfat koji se u ishrani životinja koriste kao izvor kalcijuma, a mogu sadržati jako visoke koncentracije uranijuma, čak preko 200 ppm (Aruda-Neto i sar., 2004b). Ovakvi mineralno-vitaminски dodaci stočnoj hrani, sa visokim sadržajem uranijuma, mogu predstavljati rizik po zdravlje, kako životinja tako i ljudi, a naročito dece.

Kontaminacija zemljišta usled primene fosfornih đubriva / *Phosphorus fertilizers as a source of land contamination*

Kao fosfatna đubriva u našoj zemlji se najčešće pruzvode: prosti superfosfat i dvojni superfosfat, obogaćen superfosfat, koji se međusobno razlikuju po sadržaju aktivne komponente (P_2O_5). Daljom preradom mogu se dobiti druge vrste đubriva (mešana, kompleksna) i fosfati za ishranu stoke.

Sa stanovišta radioekologije poseban interes predstavlja proučavanje migracije radionuklida u zemljištu kao dela biogenocenoze i osnovnog resursa u poljoprivrednoj proizvodnji. Osnovni fizičko-hemijski faktori koji utiču na pokretljivost radionuklida i njihovo usvajanje od strane biljaka su: kapacitet adsorpcije i sadržaj razmenjivih katjona, mineraloški i mehanički sastav, kiselost zemljišta, sadržaj organskih materija i radionuklida u zemljištu (Stojanović i sar., 1993).

Na eksperimentalnim poljoprivrednim zemljištima u Rothamstedu u Engleskoj Rothbaum i saradnici (Rothbaum i sar., 1979) su analizirali ilovačastu zemlju, koja je đubrena 85 godina superfosfatima, sa oko 33 kg P/ha godišnje (15 g U/ha). Utvrđeno je da je 0.45 mg U/kg akumulirano u oraničnom, površinskom zemljištu. Sadržaj uranijuma u zdravici (donji sloj tla, 23-46 cm) pokazuje da nema obogaćivanja uranijumom. Ovako unet uranijum u odsustvu organskih materija, najčešće huminske kiseline koja ga adsorbuje i fiksira, može postati pokre-

tan i transportovati se zemljишnim rastvorima kao šestovalentni karbonatni kompleks ili kao dvovalentni uranil jon.

Ispitujući zemljista tipa pseudoglej i černozem, Sarić i saradnici (1993) su došli do zaključka da je u proseku od 28% došlo do povećanja sadržaja uranijuma u zemljistima tretiranim fosfornim đubrivima u odnosu na netretirana zemljista u periodu od 25 godina.

Manojlović i saradnici (Manojlović i sar., 1989) nisu utvrdili značajne razlike u sadržaju uranijuma između neđubrenih zemljista i onih đubrenih fosfornim đubrivima zbog relativno male radiaktivnosti izazvane korišćenjem fosfornih đubriva. Tako, radioaktivnost izazvana jednogodišnjim đubrenjem, prema orijentacionim procenama, iznosi samo hiljaditi deo prirodne radioaktivnosti zemljista.

Kontaminacija biljaka uranijumom / *Uranium contamination of plants*

Biljne vrste poseduju različitu sposobnost akumuliranja radionuklida, bilo preko nadzemnih organa – listova, ili korenovog sistema. Biljke koje imaju plitak koren apsorbuju više radionuklida nego biljke sa dubljim korenom. Ova pojava se objašnjava time da se najveći deo radioaktivnih elemenata (oko 85%) zadržava u površinskom sloju dubine 5 cm (Đurić i Popović, 1994).

Radionuklidi, uključujući i uranijum, slede iste metaboličke i bihemijske puteve kao i njihovi analozi, što je bitno za mehanizme transporta, distribucije i nagomilavanja u pojedinim fazama biljke-zemljiste. Organske materije prisutne u zemljistima pokazuju različit uticaj na dostupnost radionuklida biljkama. U zemljistima sa visokim sadržajem humusa smanjena je apsorpcija radionuklida od strane biljaka, jer huminska kiselina apsorbuje jone metala. Sa druge strane, obrazovanje jedinjenja radionuklida sa organskim ligandima helatnog tipa povećava njihovu mobilnost u zemljistu, a samim tim i njihovu dostupnost biljkama.

Snižavanjem pH vrednosti zemljista povećava se mobilnost većine radionuklida, kao i jačina usvajanja od korenovog sistema biljaka. U opsegu pH zemljista 5.3-7.5 biljkama je uran dostupan u minimalnim količinama (Kovalevski, 1973). Stepen deponovanja uranijuma zavisi od biljne vrste i njenih genotipova, pa je i distribucija uranijuma kroz biljne organe specifična za svaku biljnu vrstu. Sarić i sar. (1993) i Stojanović i sar. (1993) su utvrdili da se uranijum najvećim delom akumulira u korenovom sistemu, delimično se distribuiru do listova, manje se zadržava u stablu, a najmanje u generativnim organima. Takođe, starost biljke i njenih organa utiče na akumulaciju uranijuma tako što se uranijum daleko više sakuplja u starim listovima nego u mladim.

Mogućnost kontaminacije životinja uranijumom / *Uranium contaminant of animals*

Životinje se mogu kontaminirati uranijumom na tri načina: preko kože, inhalacijom i ingestijom. Uranijum kao hemijski i radiloški toksičan element u organizam životinja najčešće dospeva putem ingestije. Obroci za životinje moraju biti tako izbalansirani da mogu da podmire sve potrebe životinja za hranljivim materijama, pa se stoga stočnoj hrani dodaju fosfatni mineralni dodaci. Ovi dodaci mogu sadržati radioaktivne elemente, pre svega uranijum, čime se može povećati ukupna radioaktivnost obroka za životinje. Najčešće korisćeni mineralni dodaci za ishranu goveda, svinja i živine su di- i monokalcijum fosfat, koji se dodaju radi zadovoljenja potreba životinja za Ca i P, a mogu dovesti i do konatminacije životinja uranijumom (Arrudaneto i sar., 1997; Izak-Biran i sar., 1988). Na Katedri za radiologiju i radijacionu higijenu, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, gammpektrometrijskom analizom kontrolisani su uzorci mono- i dikalcijum fosfata iz uvoza i domaće proizvodnje. Najviša izmerena aktivnost ^{238}U u uzorcima mono- i dikalcijum fosfata iz uvoza je bila 2000 Bq/kg (porekлом из Španije и из Italije), dok je u uzorku dikalcijum fosfata iz domaće proizvodnje (IHP „Prahovo“) aktivnost ^{238}U bila 1800 Bq/kg.

Ingestija uranijuma kod životinja započinje još u najranijem periodu (obično odmah posle zalučenja) i traje sve do klanja, pa se može govoriti o hroničnoj kontaminaciji. Stepen prelaza radionuklida iz digestivnog trakta se razlikuje u zavisnosti od vrste životinja, što se nadalje može sagledati preko koeficijenta prelaza (K_p) (IAEA, 1994). Koeficijent prelaza (K_p) za ^{238}U je: za kravljie mleko $4,0 \times 10^{-4}$, juneće meso $3,0 \times 10^{-4}$, svinjsko meso $6,2 \times 10^{-2}$, za živinsko meso i jaja 1. S obzirom na to da je kod živine koeficijent prelaza za ^{238}U - 1, ova vrsta je posebno ugrožena, a samim tim i meso živine može predstavljati potencijalnu opasnost u ishrani ljudi.

Nedovoljan broj stručnih radova kojim bi se potvrdilo da li uranijum u hrani za životinje zaista ima štetne efekte po zdravlje životinja i da li je realan nje gov prelaz u animalne proizvode, imaju za posledicu to da za sada ne postoje maksimalno dozvoljene koncentracije uranijuma u hrani za životinje predložene od strane Međunarodne atomske agencije i Euratom-a. Varga (2008) je, na osnovu različitih faktora i koeficijenata prelaza dao preporuku da dozvoljena aktivnost ^{238}U u hrani za preživare bude 300 Bq/kg, a u hrani za živinu 100 Bq/kg. U našoj zemlji su Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede i Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine doneli preporuku o maksimalno dozvoljenoj koncentraciji ^{238}U u uzorcima stočne hrane i dozvoljenim dodacima za stočnu hrani (br. 532-04-03129/2005-02, od 08.02.2006. god.) (tabela 1).

Tabela 1. Maksimalno dozvoljena koncentracija ^{238}U u uzorcima stočne hrane i dozvoljenim dodacima za stočnu hranu /

Table 1. Maximum permitted concentration of ^{238}U in samples of cattle feed and permitted additives for cattle feed

| Uzorak / Sample | Maksimalno dozvoljena koncentracija ^{238}U Bq/kg / Maximum permitted concentration of ^{238}U Bq/kg | |
|--|--|-----|
| Dikalcijum fosfat, Monokalcijum fosfat / <i>Dicalcium phosphate, Monocalcium phosphate</i> | 500 | |
| Hraniva, predsmeše, smeše i dozvoljeni dodaci namenjeni za ishranu goveda / <i>Feed, premixes, mixes, and permitted additives for cattle diets</i> | 500 | |
| Gotova hrana, gotove smeše za ishranu ostalih životinja / <i>Ready feed, ready mixes for diets of other animals</i> | 50 | |
| Udeo predsmeše i dozvoljenih dodataka u hrani / <i>Premixes and permitted additives that are added</i> | do 10 % u hranu / <i>Up to 10 % in feed</i> | 500 |
| | od 11 % do 15 % u hranu / <i>from 11 % to 15 % in feed</i> | 350 |
| | od 16 % do 20 % u hranu / <i>from 16 % to 20 % in feed</i> | 250 |
| | od 21 % do 25 % u hranu / <i>from 21 % to 25 % in feed</i> | 200 |
| | od 26 % do 30 % u hranu / <i>from 26 % to 30 % in feed</i> | 150 |

Zaključak / Conclusion

U cilju dobijanja zdrave i bezbedne hrane za ljudsku ishranu neophodno je stalno sprovođenje monitoringa na teritoriji Republike Srbije, sa posebnim osvrtom na lanac ishrane: zemljište – biljke – životinje – čovek. Podaci dobijeni monitoringom o nivou aktivnosti ^{238}U u životnoj sredini treba da budu osnova pri utvrđivanju granica radioaktivne kontaminacije za fosfatna mineralna đubriva i fosfatne mineralne dodatke za ishranu životinja. Takođe, potrebna je redovna kontrola fosfornih ruda iz uvoza, kao i svih proizvoda, kako iz uvoza tako i iz domaće proizvodnje. Samo na ovaj način možemo sprečiti da se uranijum iz antropogenih izvora uvede u lanac ishrane i da na taj način dospe i do čoveka kao krajnjeg potrošača.

Literatura / References

1. Arruda-Neto JDT, Tavares MV, Filadelfo M. Concentration of uranium in animal feed supplements: measurements and dose estimates. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 1997; 221: 97-104.

2. Aruda-Neto JDT, Manso Guevara MV, Nogueira GP, Saiki M, Cestari AC, Shtejer K et al. Long term accumulation of uranium in bones of Wistar rats as a function of intake dosages. *Radioactive Protection Dosimetry* 2004b; 112(3): 385-93.
3. Dangić A. Geochemijski procesi u prirodi i radionuklidi. ionizujuća zračenja u prirodi (monografija). JDZZ, Beograd, 1995, 41-56.
4. Đurić G Popović D. Radioaktivno zagađivanje biljaka. *Ekologica*, 1994, Beograd, 19-23.
5. IAEA. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in temperate environmenta. Technical reports series No. 364, Vienna, 1994.
6. Izak-Biran T, Schlesinger T, Weingarten R, Even O, Shamai Z, Israeli M. Concentrations of U and Po in animal feed supplements, in poultry meat and eggs. *Health Physics* 56; 1988: 315-9.
7. Kovalevski AL. O fiziologičeskih barierah proglašenia u rastenii po otvočenio koncentracijah urana v pitaiočen sred. *Siktikvar* 1973; 92-8.
8. Manojlović S, Bikit I, Slivka J, Vesović M, Čonkić Lj, Dozeti B, Krmar M. Da li đubriva koja sadrže fosfor zagađuju zemljišta radionuklidima iz uranovog niza. VIII Jugoslovenski simpozijum „Oštećenje zemljišta i problemi njegove zaštite“, Žabljak, 1989. *Zbornik radova*, 11-28.
9. Pantelić G, Javorina LJ, Vitorović G, Vučetić V, Tanasković I, Eremić-Savković M. Two decades of ¹³⁷Cs activity measurements in cattle feed and milk in Serbia. IRPA, Regional Congress for Central and Eastern Europe – Regional and Global Aspects of radiation protection, 24-28 September, Brasov, Romania. Available from: Final programme and Full Papers CD, 2007.
10. Rothbaum HP, McGaveston DA, Wall T, Johnston AE, Matiningly. Uranium accumulation in soil from long-continued applications of superphosphate. *J Soil Sci* 1979; 147-53.
11. Sarić M, Jocić B, Kostić M, Marinković N, Stojanović M, Ljesov D, Bikit I. Uticaj upotrebe fosfornih đubriva na sadržaj urana u zemljištu i biljkama. Uticaj upotrebe fosfornih đubriva na kontaminaciju uranom, Naučni skup SANU, 1993, knjiga 5, 57-73.
12. Sarić M, Stojanović M, Babić M. Koncentracija urana kod različitih vrsta gajenih biljaka. XI Simpozijum društva za fiziologiju biljaka. Novi Sad, 1995, 47.
13. Stojanović M, Radosavljević S, Martinović Lj. Osobine urana i njegova distribucija u zemljištu i biljkama. Uticaj upotrebe fosfornih đubriva na kontaminaciju uranom. Naučni skup SANU, 1993; knjiga 5, 1-18.
14. Stojanović M, Babić M, Stevanović D, Martinović Lj. Efekat višegodišnje primene fosfornih đubriva na kontaminaciju zemljišta Srbije. Kontaminacija zemljišta Srbije radionuklidima i mogućnost njihove remedijacije. Monografija, ITNMS 2006; 67-115.
15. Šatalov VV, Laskorin BN. Hemij estesvenih radionuklidov i Voprosi zaštiti okrucaicei sredi. Himij Urana, Nauka, Moskva, 1989, 17-56.
16. Varga B. Regulations for radioisotope content in food- and feedstuffs. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 3448-57.
17. Veselinović SD, Gržetić I, Ćarmam AŠ, Marković AD. Stanja i procesi u životnoj sredini, I knjiga. Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1995.

ENGLISH

RADIOACTIVITY OF PHOSPHATE MINERAL PRODUCTS

Branislava Mitrović, Gordana Vitorović, Mirjana Stojanović, D. Vitorović

The phosphate industry is one of the biggest polluters of the environment with uranium. Different products are derived after processing phosphoric ore, such as mineral and phosphate fertilizers and phosphate mineral supplements (dicalcium-and monocalcium phosphate) for animal feeding. Phosphate mineral additives used in animal food may contain a high activity of uranium. Research in this study should provide an answer to the extent in which phosphate mineral products (phosphate fertilizer and phosphate mineral feed additives) contribute to the contamination of soil, plants and animals.

Key words: phosphate mineral products, environment, uranium, feedstuffs

РУССКИЙ

РАДИОАКТИВНОСТЬ ФОСФАТНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Бранислава Митрович, Гордана Виторович, Мирияна Стоянович, Д. Виторович

Фосфатная промышленность представляет собой один из самых больших загрязнителей окружающей среды ураном. Обработкой руды получается большое число различных продуктов, из которых отдельно значительны фосфатные минеральные удобрения и фосфатные минеральные добавки (ди- и монокальций фосфат). Фосфатные минеральные добавки, используемые в смесях для кормления животных могут содержать высокие активности урана. Исследования в этой работе нужны подать ответ в какой мере фосфатные минеральные продукты (фосфатные удобрения и фосфатные минеральные добавки корму для скота) способствуют контаминации почвы, растений и животных

Ключевые слова: фосфатные минеральные продукты, окружающая среда, уран, корм для скота

**DIPLOMIRANI STUDENTI – DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE
– GRADUATE STUDENTS – DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE**

**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
U BEOGRADU 2010-2011. GODINE**

Đorđević Z. Jelena

Rođena 28. 08. 1984. u Kladovu
Diplomirala 27. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Ace Joksimovića 60/48

Nerandžić M. Darko

Rođen 09. 05. 1984. u Beogradu
Diplomirao 15. 12. 2010.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Bul. Mihajla Pupina 151/14

Drljević V. Saša

Rođen 01. 05. 1979. u Kolašinu,
Crna Gora
Diplomirao 27. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Kolašin
Crkvina bb

Bogunović R. Danica

Rođena 08. 05. 1985. u Beogradu
Diplomirala 22. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Vojvode Toze 20

Vasiljević D. Vlada

Rođen 15. 09. 1981. u Foči,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
16. oktobra 5/166

Dmitrašinović M. Tihomir

Rođen 18. 04. 1982. u Virovitici,
R. Hrvatska
Diplomirao 24. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Stara Pazova
Slovenski trg bb

Stanisavljević M. Blagoje

Rođen 30. 09. 1978. u Beogradu
Diplomirao 22. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Barajevo
Steve Abrlić 41

Agatonović M. Predrag

Rođen 28. 05. 1981. u Smed. Palanci
Diplomirao 21. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Smed. Palanka
Umska 10

Tufegdžić S. Dušan

Rođen 28. 03. 1979. u Šapcu
Diplomirao 21. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Banovo Polje
Zdravka Šestića 34

Mitrović P. Ivana

Rođena 28. 05. 1977. u Beogradu
Diplomirala 14. 12. 2010.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Omladinskih brigada 146/2

Urošević T. Vladan

Rođen 06. 08. 1976. u Valjevu
Diplomirao 09. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Triše Kaclerovića 4

Pejić V. Rade

Rođen 13. 08. 1985. u Gradišci,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 07. 12. 2010.
Stalno mesto boravka Laktaši
Krajiška 8

Aleksić Z. Branislav

Rođen 30. 06. 1980. u Zaječaru
Diplomirao 22. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Zaječar
Milana Miljkovića 29

Čegar M. Igor

Rođen 29. 03. 1984. u Banja Luci,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 25. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Jovana Dučića 114

Šopalović S. Vida

Rođena 07. 11. 1981. u Užicu
Diplomirala 29. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Čajetina
Mačkat

Veljković M. Ljubica

Rođena 04. 01. 1981. u Beogradu
Diplomirala 25. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Zemun
Prvomajska 15

Perić D. Tijana

Rođena 19. 09. 1984. u Beogradu
Diplomirala 26. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Živka Davidovića 108

Babić M. Milijana

Rođena 28. 04. 1984. u Lazarevcu
Diplomirala 15. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Lajkovac
Izviđačka 13

Manić D. Marija

Rođena 18. 12. 1986. u Vranju
Diplomirala 22. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Selo Krševica

Savić M. Radenko

Rođen 29. 06. 1984. u Zvorniku,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 24. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Kozluk
Kiseljak bb

Stojanović Z. Branko

Rođen 17. 08. 1983. u Nišu
Diplomirao 23. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Niš
Bul. Nemanjića 88/14

Kandić N. Petar

Rođen 13. 12. 1978. u Kraljevu
Diplomirao 23. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Kraljevo
Oktobarskih žrtava 53

Suvajac S. Igor

Rođen 13. 05. 1983. u Prnjavoru
R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Prnjavor
Gornja Ilova bb, R. Srpska, BiH

Dragić V. Branko

Rođen 11. 09. 1984. u Brčkom, BiH
Diplomirao 24. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Donja Bukovica 120

Kuzmanović M. Mirjana
Rođena 07. 12. 1984. u Šapcu
Diplomirala 23. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Vladimirci
Skupljen

Savčić R. Nikola
Rođen 13. 03. 1974. u Zemunu
Diplomirao 19. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Pere Velimirovića 66

Pazman B. Aleksandra
Rođena 25. 04. 1981. u Beogradu
Diplomirala 11. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Bul. Kralja Aleksandra 17

Milaš Đ. Marjan
Rođen 29. 05. 1982. Zemun
Diplomirao 11. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Zemun
Karađorđev trg 10/9

Bukvić Z. Maja
Rođena 30. 06. 1985. u Pančevu
Diplomirala 12. 11. 2010.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Gandijeva 44/15

Živanović S. Miloš
Rođen 23. 06. 1980. u Beogradu
Diplomirao 12. 11. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
I maj 1/5

Pavlović M. Mladen
Rođen 03. 12. 1984. u Beogradu
Diplomirao 18. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Višegradska 3

Paunović Ž. Jelena
Rođena 21. 04. 1982. u Beogradu
Diplomirala 21. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Straška Pindžura 21

Tadić I. Vukašin
Rođen 06. 05. 1983. u Beogradu
Diplomirao 22. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Kneza od Semberije 7

Smiljanić Lj. Milijana
Rođena 07. 12. 1979. u Šapcu
Diplomirala 22. 10. 2010.
Stalno mesto boravka M. Belotić
Kralja Aleksandra 21

Pantelić M. Miloš
Rođen 07. 01. 1983. u Loznicu
Diplomirao 11. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Mali Zvornik
Ribarska 42

Rangelov R. Branislav
Rođen 09. 11. 1983. u Vranju
Diplomirao 19. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Pere Ćetkovića 31/14

Kostić B. Goran
Rođen 27. 04. 1984. u Banja Luci
R. Srpska, BiH
Diplomirao 22. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Gavrila Principa 37

Kotaraš M. Milena
Rođena 24. 09. 1980. u Kninu
R. Hrvatska
Diplomirala 15. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Rakovički put 7e

Stojić M. Nikola

Rođen 27. 06. 1982. u Valjevu
Diplomirao 19. 10. 2010.
Stalno mesto boravka
14206 bb

Savić S. Nemanja

Rođen 27. 05. 1980. u Šapcu
Diplomirao 14. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Šabac
Vlade Jovanović 29/2

Bastajić J. Miroslav

Rođen 23. 03. 1983. u Karlovcu
R. Hrvatska
Diplomirao 22. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Nede Spasojević 22

Katanić M. Dušan

Rođen 08. 12. 1979. u Lazarevcu
Diplomirao 25. 12. 2009.
Stalno mesto boravka Lazarevac
Milana Kojića 28

Marković J. Stevica

Rođen 28. 12. 1984. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Vršani

Pepić Đ. Marijana

Rođena 11. 05. 1981. u Kikindi
Diplomirala 04. 10. 2010.
Stalno mesto boravka Banatsko
Veliko Selo, Stojana Matića 80

Mađarac M. Sandro

Rođen 26. 07. 1981. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 14. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Svetog Save 4

Tufegdžić B. Ivan

Rođen 01. 02. 1983. u Valjevu
Diplomirao 21. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Valjevo
Lepenička 6

Nikolić M. Sanja

Rođena 18. 01. 1981. u Beogradu
Diplomirala 23. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Borivoja Stevanovića 45

Dragović D. Dalibor

Rođen 21. 08. 1981. u Beogradu
Diplomirao 21. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Obrenovac
Vojvode Putnika 7

Miletić R. Dušan

Rođen 23. 03. 1984. u Kragujevcu
Diplomirao 14. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Kragujevac
Slobodana Jovanovića 38

Kubatović P. Tamara

Rođena 16. 05. 1984. u Subotici
Diplomirala 22. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Subotica
Servo Mihalj 37

Nadaškić Z. Marko

Rođen 08. 05. 1980. u Beogradu
Diplomirao 23. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Džordža Vašingtona 38a

Lužajić M. Tijana

Rođena 08. 01. 1985. u Beogradu
Diplomirala 22. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Veljka Petrovića 122

Milovanović R. Marko

Rođen 27. 09. 1980. u Lazarevcu
Diplomirao 21. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Lazarevac
Dositeja Obradovića 46

Milivojević V. Željko

Rođen 04. 07. 1983. u Beogradu
Diplomirao 28. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Stubline
Trstenica 177

Kovačević B. Dražen

Rođen 20. 07. 1984. u Tesliću,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 28. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Teslić
Jovana Dučića H-50

Lukač M. Miloslav

Rođen 30. 09. 1982. u Pančevu
Diplomirao 07. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Kovačica
Ive Andrića 16

Vukelić Z. Biljana

Rođena 04. 12. 1978. u Beogradu
Diplomirala 14. 09. 2010.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Dr Ivana Ribara 161/41

Ivanović S. Jelena

Rođena 13. 10. 1985. u G. Milanovcu
Diplomirala 02. 09. 2010.
Stalno mesto boravka Beograd
Braće Jerković 84/15

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

VETERINARSKI GLASNIK je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beožgradu, 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 stavljuju 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 trgovачkim 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 zarezom. 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 korste 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 tekstrom se stavlja iznad tabele, 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, Velev 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 veterinara 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