

Sadržaj teških metala u tri kultivirane vrste gljiva



Nina Bilandžić*, B. Čalopek, Marija Sedak, Božica Solomun Kolanović,
Ivana Varenina, Đurdica Božić, Ines Varga i Maja Đokić

Uvod

Gljive se stoljećima koriste u prehrani i pripremaju se na razne načine. Karakterizira ih posebna tekstura i okus te imaju posebna hemijska i nutritivna svojstva jer su izvrstan izvor bjelančevina (20-30% suhe tvari), odnosno esencijalnih aminokiselina, dijetalnih vlakana, različitih makro i esencijalnih elemenata (uglavnom kalij, fosfor, magnezij, kalcij, bakar, željezo, cink i) te imaju malo masnoća i kolesterola (Ghorai i sur., 2009., Kalač, 2009.). Isto tako su dobar izvor vitamina s visokom razinom riboflavina (vitamina B₂), niacina, folata i tragova vitamina C, B₁, B₁₂, D i E. Jedini su prirodni izvor hrane koja sadrži vitamin D neživotinjskog podrijetla (Valverde i sur., 2015.). Gljive se koriste i u terapeutske svrhe odnosno pri sprječavanju bolesti kao što su: hipertenzija, hipercolesterolemija te u prevenciji teških bolesti odnosno raka (Netravathi i sur., 2006.).

Danas se na svim kontinentima u svijetu pa tako i u Hrvatskoj sakuplja i konzumira veliki broj vrsta samoniklih gljiva. Konzumira se kao delikatesa u pojedinim vrstama populacije koje je tradicionalno sezonski koriste i čini im važan dio prehrane zbog nutritivnih

svojstava (Beluhan i Ranogajec, 2011.). Kao važan dio ekosustava, samonikle gljive razgrađuju substrat, odnosno tlo te pri tome koriste otpad iz poljoprivredne proizvodnje i mogu akumulirati visoke koncentracije teških metala što ih čini dobrim pokazateljem onečišćenja (Falandyś i sur., 2007., Kalač, 2010., Liu i sur., 2012.). Zbog toga se većina današnjih studija odnosi na sadržaj elemenata, odnosno teških metala u raznim jestivim i nejestivim šumskim gljivama, Cocchi sur., 2006., Isildak i sur., 2007., Sesli i sur., 2008., Genccelep i sur., 2009., Kalač, 2010., Mirończuk-Chodakowska i sur., 2013.). Visoke koncentracije metala u samoniklim gljivama utvrđene su u područjima kontaminiranim industrijskim otpadom, poljoprivrednim sredstvima, rudama i otpadom rudarstva, odnosno u okolini metalnih talionica, kanalizacijskog mulja i autocesta (Kalač i sur., 2004., Isildak i sur., 2007.).

Među kultiviranim vrstama gljiva danas su za konzumaciju najbolje priljavačene *Agaricus bisporus* - šampinjoni, *Pleurotus ostreatus* - bukovače i *Lentinula edodes* - shiitake. Kina je najveći svjetski proizvođač gljiva i proizvodi 65% svjetske proizvodnje, a

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ*, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica (dopisni autor, e-mail: bilandzic@veinst.hr), Bruno ČALOPEK, dipl. ing. prehr. tehnol., Marija SEDAK, dipl. ing. prehr. tehnol., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. biotehnol., Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Đurdica BOŽIĆ LUBURIĆ, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. primj. kem., Maja ĐOKIĆ, dipl. ing. kem. tehnol. Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

u Europi su najveći proizvođači Italija, Nizozemska i Spanjolska (Očić, 2014.). Šampinjoni, *Agaricus bisporus* su najčešće i naširoko konzumirane gljive na svijetu. Prirodno rastu u poljima i travnatim područjima nakon kiše od kasnog proljeća do jeseni. Najčešće se kultiviraju i uzgajaju te njihova proizvodnja postoji u više od sedamdeset zemalja svijeta (Koyyalamudi i sur., 2009.). Karakterizira ih nešto manje od 10% suhe tvari u kojoj je čak 39% bjelančevina i vrlo nizak sadržaj masti od 2,1% (Vetter, 2003.). *Pleurotus ostreatus*, bukovača je česta jestiva gljiva raširena u mnogim umjerenim i suptropskim područjima diljem svijeta te raste od rujna do prosinca na panjevima bjelogoričnog drveća (topola, orah, bukva, javor, bagrem itd.) i najčešća je u bukovim šumama, obično na mjestima gdje je drvo devastirano (Rop i sur., 2009.). *Lentinula edodes*, shiitake gljiva raste u skupinama na raspadajućem drvetu bjelogorica, kestena, hrasta, javora, bukve, topole, itd. Podrijetlom je iz Istočne Azije gdje se uzgaja već više od 1000 godina, odnosno njihovo primarno stanište su topla i vlažna klima Kine, Koreje i Japana (Wasser, 2004.). Zbog svog sastava ove gljive imaju povoljan učinak na brojne zdravstvene probleme u ljudi, uključujući jačanje imunosnog sustava odnosno u liječenju nekih ozbiljnih bolesti (Oba i sur., 2009.). Beta-glukani, odnosno pleuran iz bukovača ili lentinan iz shiitaka, pokazali su antikarcinogeno djelovanje, stimuliraju imunitet te mogu sudjelovati u fiziološkim procesima koji se odnose na metabolizam masti u ljudskom tijelu, što rezultira smanjenjem ukupnog sadržaja kolesterola u krvi, a može doprinijeti i smanjenju tjelesne težine (Rop i sur., 2009.).

U Hrvatskoj je kao i u svijetu dostupan mali broj studija koje se odnose na sadržaj teških metala u kultiviranim vrstama gljiva za ljudsku prehranu (Mattila i sur., 2001., Vetter, 2003., Mallikarjuna i sur., 2013., Širić i sur., 2014.). Stoga je svrha

ovog rada odrediti sastav teških metala u tri kultivirane vrste gljiva: šampinjonima (*Agaricus bisporus*), bukovačama (*Pleurotus ostreatus*) i shiitakama (*Lentinula edodes*) koje su izvorno uzgojene na gospodarstvima središnje Hrvatske.

Materijali i metode

Uzorkovanje gljiva

Tri vrste gljiva šampinjoni (*Agaricus bisporus*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i shiitake (*Lentinula edodes*) kultivirane u Hrvatskoj s oznakom Hrvatski proizvod su prikupljene u opskrbnim lancima zagrebačke regije.

Gljive su pažljivo isprane s destiliranom vodom, zatim su sušene na 105 °C tijekom 24 sata do konstantne mase. Osušeni uzorci su homogenizirani i pohranjeni u polietilenskim bocama do analize. Sadržaj vlage je izračunat za svaki uzorak i izražen u postotcima.

Kemikalije i standardi

Kemikalija HNO_3 je nabavljena od Mercka (Darmstadt, Njemačka). U analizama je korištena ultračista voda (18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$) dobivena sustavom Milli Q Advantage 10V (Merck Millipore, USA). Za kalibraciju instrumenta korišten je certificirani standard koji se sastoji od As, Cd, i Pb koncentracija 10 mg/L (Environmental Calibration Standard, Agilent Technologies, SAD). Radni standardi za kalibracijsku krivulju su pripremani razrijedivanjem certificiranog standarda s 5% konc. HNO_3 . Kao interni standard za ICP-MS koristio se certificirani standard koji se sastoji od Bi i In koncentracije 20 mg/L (Inorganic Ventures, Christiansburg, VA, SAD).

Za kalibraciju instrumenta za određivanje Hg korišten je certificiran standard Hg od 1000 mg/L (Perkin Elmer, SAD). Radni standard Hg pripreman je dodatkom 1 mL HNO_3 (konc.), 0,1 mL 10% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, i 0,1 mL HCl (konc.) te je čuvan u tamnom staklenom odmjernom

posuđu. Za rad uređaja za određivanje metala korišten je argon visoke čistoće (99,999%, White Martins, Brazil).

Priprema uzorka

Uzorci gljiva su pripremani mokrim spaljivanjem u mikrovalnoj pećnici Multiwave 3000 (Anton Paar, Njemačka). Uzorci (0,5 g) se važu u teflonske posudice te se doda 3 mL H₂O i 2,5 mL HNO₃ (65%). Mikrovalna se digestija provodi

u tri koraka: prvi korak snage 500 W 1 minutu te zadržavanje 1,5 minute, drugi korak na 1000 W 5 minuta te zadržavanje 15 minuta te treći korak 1200 W 5 minuta i zadržavanje 25 minuta. Bistra otopina kvantitativno se prenosi u odmjerne tikvice od 50 mL te dopuni do oznake ultračistom vodom.

Koncentracije metala su izražavane u µg/kg suhe mase. Uzorci su analizirani u serijama koje su uključivale negativan

Tabela 1. Uvjeti rada i pokazatelji mjerena za ICP-MS.

Spektrometar:	Agilent Technology 7900	
Način unosa uzorka:	PeriPump	
Tip raspršivača:	MicroMist	
Sučelje:	Pt-konovi	
RF snaga:	1550 W	
Brzina protoka Ar (L/min)		
Plazma:	15	
Sporedni protok:	0,9	
Raspršivač:	0,1 rps	
Brzina protoka He:	0,03 mL/min	
Model ionskih leća:	x-leće	
Voltaža leća:	10,7 V	
Omega bias:	-90 V	
Omega leća:	10,2 V	
Akvizicijski način rada:	Spectrum	
Uzorak pika:	1 point	
Replike:	3	
Integriranje/repliki:	100	
Brzina unosa uzorka:	0,3 rps	
Način rada	Bez plina	He
Plazma mod	Opća namjena	Opća namjena
Vrijeme stabilizacije (sec)	0	5
Vrijeme integracije/masi(sec)	0,1	0,5
Izotopi:		
Bez plina:	Pb ²⁰⁸	
He mode:	As ⁷⁵ , Cd ¹¹¹	
Interni standardi:	Bi, In	

uzorak, standarde za kalibracijsku krivulju i dva uzorka s dodanim metalima. Određene su granice određivanja metala (LOD) izračunom koji odgovara tri puta standardnim devijacijama deset slijepih uzoraka ($\mu\text{g/kg}$): As 10, Cd 1, Hg 1, Pb 1.

Određivanje metala

Koncentracije As, Cd i Pb određene su primjenom instrumenta induktivno spregnute plazme s masenim detektorom ICP-MS model Agilent 7900 (Agilent, SAD). Uvjeti rada instrumenta ICP-MS prikazani su u Tabeli 1.

Živa je određivana na živinom analizatoru AMA-254 (Advanced Mercury Analyzer, Leco, Poljska), direktnim spašljivanjem uzorka u atmosferi bogatoj kisikom pri valnoj duljini od 253,65 nm.

Izračun procjene dnevnog i tjednog unosa metala (EDI/EWI)

Izračun procjene dnevnog unosa (EDI) proveden je prema formuli:

$$\text{EDI} (\mu\text{g/kg/tjel. masa/dan}) = \frac{(\text{konzentracija elementa, } \mu\text{g/kg}) / (\text{količina obroka ili dnevni unos hrane, kg})}{\text{težina odrasle osobe (70 kg)}}$$

Za teške se metale procjenjuje tjedni unos (EWI) i izražava kao $\mu\text{g/tjedan}$ prema jednadžbi: $\text{EWI} (\mu\text{g/kg/tjedan}) = \text{EDI} \times 7$

Za izračun je korištena prosječna potrošnja gljiva od 100 g po porciji (Mirończuk-Chodakowska i sur., 2013.) te prosječna tjelesna težina od 70 kg po odrasloj osobi (EFSA, 2012.). Vrijednosti EDI/EWI korištene su za izračun doprinosa svakog elementa u odnosu na toksikološke vrijednosti privremenog podnošljivog tjednog unosa (PTWI, *provisional tolerable weekly intake*)

Statistička analiza

Statistička obrada rezultata provedena je primjenom programa Statistica® 10 (StatSoft® Inc., SAD). Koncentracije metala u tri vrste kultiviranih gljiva izražavane su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) suhe mase, minimum i maksimum. Statistički značajne razlike u koncentracijama metala između tri vrste gljiva određene su primjenom Student *t*-testa. Statistički značajne razlike izražavane su na nivou značajnosti $P < 0,05$.

Rezultati i rasprava

Sadržaj metala u tragovima u gljivama primarno ovisi o vrsti gljive, te drugim faktorima kao što su geografsko područje, sastav tla tj. supstrata, odnosno o sadržaju kiselih i organskih tvari u ekosustavu tla, dobu plodnih tijela i micelija te izvorima i udaljenosti od izvora zagadenja (Kalač i sur., 2004., Kalač, 2010.). Micelij gljiva akumulira sve vrste elemenata, uključujući teške metale te u klobuku gljiva koncentracije elemenata mogu biti veće od onih u podlozi, odnosno substratu na kojem rastu (Gadd, 2003.). Polisaharidne komponente stanične stijenke gljiva, kao što je hitin imaju svojstvo fiksiranja elemenata na funkcionalnim skupinama (fosfat, karboksil, amin, i sl.) te se elementi brzo prenesu u stanicu i kruže cijelim micelijem. Kapacitet nakupljanja metala svake vrste određen je s genetskom predispozicijom gljiva te je posljedica prisutnosti specifičnih proteina i drugih makromolekula uključenih u prihvati i transport metala (Campos i sur., 2009.).

Sadržaj teških metala u tri vrste kultiviranih gljiva

Koncentracije vlage i metala As, Cd, Hg i Pb određene u tri vrste gljiva prikazane su u Tabeli 2. Sadržaj vlage u tri vrste gljiva određen je u rasponu od 91-

92,3%. Metali su određeni su u rasponima ($\mu\text{g}/\text{kg}$, suha masa): As 25,0-275,6, Cd 30,6-294,0, Hg 2-3, Pb 4,78-31,7. Redoslijed koncentracija metala prema vrsti gljiva je: As i Pb bukovače > šampinjoni > shiitake; Cd šampinjoni > bukovače > shiitake; Hg

bukovače > šampinjoni i shiitake. Najviše srednje vrijednosti metala određene su u gljivama ($\mu\text{g}/\text{kg}$, suha masa): shitake: Cd 274,8; bukovače: As 158,2, Pb 18,4, Hg 2,99. Statistički značajno niže koncentracije As određene su u shiitaka gljivama u

Tabela 2. Koncentracije teških metala u tri vrste kultiviranih gljiva.

Vrsta gljiva	Vлага (%)	Metal ($\mu\text{g}/\text{kg}$ suhe mase)				
		Statistika	As	Cd	Hg	Pb
<i>Agaricus bisporus</i> (šampinjon)	92,3	Sr. vrij. \pm SD	101,4 \pm 6,4 ^{ab}	103,2 \pm 66,6 ^c	2,44 \pm 0,45	11,9 \pm 6,46
		Min-max	54,9 - 158,8	30,6 - 182,8	1,78 - 3,11	4,79 - 23,7
<i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača)	90,9	Sr. vrij. \pm SD	158,2 \pm 71,7 ^b	85,5 \pm 51,8 ^d	2,99 \pm 0,76	18,4 \pm 7,74 ^e
		Min-max	98,0 - 275,6	33,4 - 158,6	1,65 - 3,34	10,9 - 31,7
<i>Lentinula edodes</i> (shiitaka)	91,0	Sr. vrij. \pm SD	39,4 \pm 15,3 ^a	274,8 \pm 17,7 ^{c,d}	1,54 \pm 0,43	8,07 \pm 1,59 ^e
		Min-max	25,0 - 64,0	246,5 - 294,0	1,12 - 2,23	6,47 - 9,93

Statistički značajne razlike između gljiva za metale: a,b As (P<0,01); c,d Cd (P<0,001); e Pb (P<0,01)

Tabela 3. Koncentracije metala Cd i Pb u kultiviranim i samoniklim šampinjonima, bukovačama i shiitakama iz drugih zemalja.

Vrsta gljiva	Kultivirane/ samonikle	Zemlja podrijetla	Cd (mg/kg, s.t.)	Pb (mg/kg, s.t.)	Reference
<i>Agaricus bisporus</i> (šampinjon)	kultivirane	Mađarska	0,22		Vetter, 2003.
	samonikle	Turska	1,7		Isildak i sur., 2004.
	samonikle	Republika Češka	3,5		Kalač i sur., 2004.
	samonikle	Turska	1,22	2,02	Isildak i sur., 2007.
	kultivirane	Poljska	0,03	0,09	Mirończuk-Chodakowska i sur., 2013.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača)	samonikle	Kina	0,28	0,67	Zhu i sur., 2010.
	samonikle	Rumunjska	0,95	0,64	Stih i sur., 2011.
	kultivirane	Poljska	0,03	1,20	Mirończuk-Chodakowska i sur., 2013.
<i>Lentinula edodes</i> (shiitaka)	samonikle	Kina	0,21	0,92	Zhu i sur., 2010.
	kultivirane	Poljska	0,12	0,42	Mirończuk-Chodakowska i sur., 2013.

odnosu na koncentracije u šampinjonima i bukovačama ($P<0,01$, oba). Suprotno od toga, značajno više koncentracije Cd utvrđene su u shiitakama u odnosu na koncentracije u šampinjonima i bukovačama ($P<0,001$, oba). Značajno viši sadržaj Pb određen je u bukovačama u odnosu na shiitake ($P<0,01$).

Visoki postotci vlage utvrđeni u tri vrste gljiva su u skladu s prijašnjim radovima u kojima su se sadržaj vlage kretao od 80 do 95 g na 100 g (Ghorai i sur., 2009., Kalač, 2009.). Koncentracije metala određene u ovome istraživanju uspoređene su s vrijednostima u tri ispitivane vrste gljiva u istraživanjima provedenim u drugim zemljama (Tabela 3). Postoji mali broj literaturnih podataka vezan za koncentracije metala u kultiviranim gljivama. Koncentracije Cd određene u ovome radu u šampinjonima i bukovačama slične su koncentracijama određenim u tim kultiviranim gljivama u prijašnjim istraživanjima (0,03–0,22 mg/kg; Vetter, 2003., Miroćzuk-Chodakowska i sur., 2013.). Međutim koncentracije određene u shiitakama su za više od dva puta veće nego u tim kultiviranim gljivama iz Poljske (Miroćzuk-Chodakowska i sur., 2013.). Općenito je utvrđeno da su razine metala (Cd, Hg i Pb) u samoniklim šampinjonima znatno više od onih u kultiviranim (Kalač i sur., 2004.). Općenito se u literaturi sadržaj Cd u samoniklim gljivama kreće u rasponu 0,10–5 mg/kg (Kalač, 2010.). U samoniklim bukovačama sadržaj Cd određen je od 0,03 do 0,95 mg/kg, odnosno u shiitakama od 0,12 do 0,21 mg/kg (Kalač i sur., 2004., Zhu i sur., 2010., Stih i sur., 2011., Miroćzuk-Chodakowska i sur., 2013.). Koncentracije Cd u samoniklim šampinjonima određivane su od 0,03 do 5 mg/kg (Demirbas, 2001., Kalač i sur., 2004., Isildak i sur., 2004., 2007.).

U ovome istraživanju koncentracije Pb utvrđene u šampinjonima slične su onima utvrđenim u kultiviranim gljivama iz Poljske od 0,09 mg/kg (Miroćzuk-Chodakowska i sur., 2013.). Međutim, u

druge dvije vrste gljiva koncentracija Pb je za 15 i više puta niža od literaturnih podataka. Tako su u kultiviranim gljivama iz Poljske najveće koncentracije Pb utvrđene u bukovačama (1,20 mg/kg; Miroćzuk-Chodakowska i sur., 2013.) dok su u radovima u samoniklim gljivama najveće koncentracije utvrđene u šampinjonima iz Turske (2,02 mg/kg; Isildak i sur., 2007.). Koncentracije Pb u prijašnjim istraživanjima u samoniklim gljivama su u rasponima (mg/kg): 0,40–2,80 (Svoboda i sur., 2000.), 1,43–4,17 (Tüzen, 2003.), 0,82–1,99 (Soylak i sur., 2005.), 0,9–2,6 (Sesli i sur., 2008.), 0,67–12,9 (Zhu i sur., 2010.) odnosno 0,10–10 (Kalač, 2010.). Izuzetno visoki sadržaj Pb, više od 100 mg/kg suhe tvari, izmjerena je u gljivama u neposrednoj blizini topionica Pb (Kalač i sur., 1991.). U prijašnjim istraživanjima utvrđeno je da se koncentracije Pb u samoniklim šampinjonima kreću od 0,1 do 2 mg/kg (Isildak i sur., 2004., 2007., García i sur., 2009.).

Koncentracije Hg izmjerene u ovom istraživanju u sve tri vrste gljiva su znatno niže (0,0015–0,0029 mg/kg) od literaturnih vrijednosti. U samoniklim šampinjonima iz Španjolske koncentracije Hg su se kretale u rasponu 0,5–1,5 mg/kg (Melgar i sur., 2009.). U nekim samoniklim gljivama kao što je *Leccinum necator* ili *Leccinum rufum* određene su koncentracije Hg i do 2,4, odnosno 2,6 mg/kg (Falandysz i sur., 2004.). U nekim vrstama samoniklih gljiva (*Agaricus macrosprus*, *Boletus pinophilis*) određene su izuzetno visoke koncentracije Hg, i preko 5 mg/kg (Melgar i sur., 2009.). Povišene vrijednosti Hg su utvrđene u jestivim i nejestivim vrstama gljiva iz područja šuma (Falandysz i sur., 2007., Melgar i sur., 2009.). Sadržaj Hg znatno je povišen u gljivama iz kontaminiranih područja, kao što su u blizina talionice Hg ili u prijašnjim rudarskim područjima u odnosu na nezagadlena područja (Svoboda i sur., 2000., 2006.). Pri tome koncentracije Hg mogu biti veće i od 20 mg/kg suhe tvari (Kalač i sur., 2004.).

Gotovo da i nema literaturnih podataka za koncentracije As u gljivama. U šampinjonima podrijetlom iz Bugarske utvrđene su koncentracije As manje od 0,05 mg/kg (Vetter, 2003.). U ovome istraživanju u šampinjonima su određene dvostruko više vrijednosti As od 101,4 µg/kg, odnosno trostruko više u bukovačama (158,2 µg/kg), dok su u shiitakama bile 39,4 µg/kg.

Procjena unosa metala i doprinos u odnosu na toksikološke vrijednosti

Kadmij i olovo nemaju nikakvu korisnu ulogu u ljudskom metabolizmu te izazivaju progresivnu toksičnost. U prekomjernim koncentracijama Cd izaziva niz negativnih efekata na bubrege, pluća, jetru, skeletni i reproduktivni sustav te može prouzročiti rak. Olovo se nakuplja u kostima i može se vezati umjesto kalcija te stvara zdravstvene poremećaje kao što su: nesanica, umor, poremećaj sluha i mršavljenje (Zhu i sur., 2011.).

Iako As može biti esencijalan još uvijek nije razjašnjena njegova uloga u

organizmu. Njegov se toksični učinak u ljudi sastoji od utjecaja na hormonske regulacije i hormone koji posreduju pri transkripciji gena, mitohondrijske enzime pri čemu koći mehanizam staničnog disanja, reproducijsku toksičnost uz gubitak ploda. Nakupljanjem u organizmu izaziva i hiperpigmentaciju i keratozu, kardiovaskularne bolesti, neuropatiju te može utjecati na verbalnu komunikaciju i dugoročno pamćenje (Kapaj i sur., 2006.).

Živa je svakako jedan od najproblematičnijih zagađivača okoliša, posebice zbog svog svojstva da se isparava i širi atmosferom kroz dugo vrijeme. Jedan je od najviše toksičnih elemenata za ljude i sve vrste životinja, posebice u opasnoj formi metil-Hg koja utječe na živčani sustav te izaziva obamrlost nogu i ruku, probleme s vidom, demenciju i depresiju (Morris i sur., 2005.).

Prema legislativi Europske unije najviše dopuštene koncentracije toksičnih metala u tri kultivirane vrste gljiva su (mg/kg vlažne mase): Cd 0,2 i Pb 0,3 (EC, 2006.). U ovom istraživanju koncentracije

Tabela 4. Procjena dnevnih i tjednih unosa (EDI, EWI) metala za tri vrste gljiva i izračun doprinosa u odnosu na toksikološke vrijednosti

Metal	Vrsta gljiva	EDI (µg/dan)	EWI (µg/tjedan)	Doprinos PTWI (%)
As	šampinjoni	0,15	1,01	6,76
	bukovače	0,23	1,58	10,6
	shiitake	0,056	0,39	2,63
Cd	šampinjoni	0,15	1,03	41,3
	bukovače	0,12	0,86	34,2
	shiitake	0,39	2,75	109,9
Hg	šampinjoni	0,003	0,024	0,61
	bukovače	0,004	0,030	0,75
	shiitake	0,002	0,02	0,39
Pb	šampinjoni	0,017	0,12	0,48
	bukovače	0,026	0,18	0,74
	shiitake	0,001	0,081	0,32

Cd i Pb izražene na vlažnu masu su ispod propisanih vrijednosti za sve tri ispitivane vrste gljiva. Za Hg u hrani nisu propisane najviše dopuštene koncentracije. Neke članice EU imaju vlastite vrijednosti za metale. Republika Češka je odredila najviše dopuštene vrijednosti za As, Cd, Hg i Pb u samoniklim, odnosno kultiviranim gljivama (mg/kg suhe tvari): samonikle 3, 3, 5 i 10; kultivirane 3, 1, 1 i 3, redom (Kalač, 2010.).

U svrhu procjene rizika toksičnih metala u gljivama izračunat je dnevni, odnosno tjedni unos (EDI/EWI) te uspoređen s toksikološkim vrijednostima. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Ured za hranu i poljoprivredu (FAO) su za procjenu potencijalnog rizika toksičnih elemenata na zdravlje ljudi odredili vrijednosti privremenog podnošljivog tjednog unosa PTWI ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{tjel.mase}$): Cd 2,5 (EFSA, 2011.); As 15, Pb 25 (FAO/WHO, 1993.); Hg 4 (JECFA, 2010.). Tabela 4 prikazuje izračunate EDI/EWI vrijednosti za ukupne srednje vrijednosti toksičnih metala za tri vrste gljiva i njihov doprinos propisanoj PTWI vrijednosti.

Koncentracije As određene u tri vrste gljiva doprinose PTWI vrijednosti (%): shiitake 2,63, šampinjoni 6,76, bukovače 10,6. Najveći doprinos prema PTWI za Cd od 109,9% pokazale su shiitake, dok je za šampinjone, odnosno bukovače određen doprinos od 41,3%, odnosno 34,2%. Doprinosi određenih koncentracija Hg i Pb prema PTWI vrijednostima za sve tri vrste gljiva su ispod 1%. Može se zaključiti da konzumacija ove tri vrste gljiva u većim količinama ne predstavlja opasnost za zdravlje obzirom na unos metala As, Hg i Pb. Međutim, obzirom na izmjerene koncentracije Cd konzumacija većih količina shiitaka, odnosno višestruko tjedno uzimanje ovih gljiva može imati rizik za potrošače.

Sažetak

U ovome istraživanju prikupljene su u opskrbnim lancima zagrebačke regije tri kul-

tivane vrsta gljiva proizvedene u Hrvatskoj: šampinjoni (*Agaricus bisporus*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i shiitake (*Lentinula edodes*). Koncentracije toksičnih metala arsena (As), kadmija (Cd) i olova (Pb) određene su primjenom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP-MS), dok je živa (Hg) određena na živinom analizatoru. Sadržaj metala je određen na suhu masu te je određena vлага u tri vrste gljiva u rasponu od 91-92,3%. Metali su određeni u rasponima ($\mu\text{g}/\text{kg}$, suha masa): As 25,0-275,6, Cd 30,6-294,0, Hg 2-3, Pb 4,78-31,7. Najviše srednje vrijednosti metala određene su u ($\mu\text{g}/\text{kg}$, suha masa): shiitake: Cd 274,8; bukovače: As 158,2, Pb 18,4, Hg 2,99. Statistički značajno niže koncentracije As određene su u shiitaka gljivama u odnosu na koncentracije u šampinjonima i bukovačama ($P<0,01$, oba). Značajno više koncentracije Cd utvrđene su u shiitakama u odnosu na koncentracije u šampinjonima i bukovačama ($P<0,001$, oba). Značajno više sadržaj Pb određen je u bukovačama u odnosu na shiitake ($P<0,01$). U svrhu procjene rizika toksičnih metala u gljivama izračunat je dnevni odnosno tjedni unos ovih metala te uspoređen s toksikološkim vrijednostima privremenog podnošljivog tjednog unosa (PTWI). Koncentracije As određene u tri vrste gljiva doprinose PTWI vrijednosti od 2,63 do 10,6%. Najveći doprinos prema PTWI za Cd od 109,9% izračunat je za shiitake, dok je za šampinjone, odnosno bukovače određen doprinos od 41,3, odnosno 34,2 %. Živa i Pb za sve tri vrste gljiva doprinose PTWI vrijednostima ispod 1%. Stoga se može zaključiti da konzumacija ove tri vrste gljiva u većim količinama ne predstavlja opasnost za zdravlje obzirom na unos As, Hg i Pb. Međutim, konzumacija većih količina shiitaka obzirom na izmjerene koncentracije Cd, odnosno njihovo višestruko tjedno uzimanje može predstavljati rizik za potrošače.

Ključne riječi: kultivirane gljive, šampinjoni, shiitake, bukovače, teški metali, ICP-MS

Literatura

1. BELUHAN, S. and A. RANOJAJEC (2011): Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chem.* 124, 1076-1082.
2. CAMPOS, J. A., N. A. TEJERA and C. J. SANCHEZ (2009): Substrate role in the accumulation of heavy

- metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals* 22, 835-841.
3. COCCHI, L., L. VESCOVI, L. E. PETRINI and O. PETRINI (2006): Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chem.* 98, 277-284.
 4. DEMİRBAŞ, A. (2001): Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. *Food Chem.* 75, 453-457.
 5. EC (2006): European commission, regulation (EC) no. 1881 (2006): 19 of December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal L364*, 5-24.
 6. EFSA (2011): Scientific opinion. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, 9, 1975.
 7. EFSA (2012): Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10, 2579.
 8. FAO/WHO (1993): Evaluation of certain Food Additives and Contaminants, 41st report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report Series, No. 837, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 9. JECFA (2010): Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-second meeting. Summary and conclusions. Food and agriculture organization of the United Nations World Health Organization. JECFA/72/SC. Rome, Italy.
 10. FALANDYSZ, J., A. JĘDRUSIAK, K. LIPKA, K. KANNAN, M. KAWANO, M. GUCIA, A. BRZOSTOWSKI and M. DADEJ (2004): Mercury in wild mushrooms and underlying soil substrate from Koszalin, north-central Poland. *Chemosphere* 54, 461-466.
 11. FALANDYSZ J., A. FRANKOWSKA, and A. MAZUR (2007): Mercury and its bioconcentration factors in King Bolete (*Boletus edulis*). *J. Environ. Sci. Health Part A* 42, 2089-2095.
 12. GADD, G. M. (2003): Geomycology: fungi in mineral substrate. *Mycologist* 17, 98-107.
 13. GARCÍA, M. Á., J. ALONSO and M. J. MELGAR (2009): Lead in edible mushrooms. Levels and bioaccumulation factors. *J. Hazard. Mat.* 167, 777-783.
 14. GENCLEEP, H., Y. UZUN, Y. TUNCTURK and K. DEMIREL (2009): Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chem.* 113, 1033-1036.
 15. GHORAI, S., S. P. BANIK, D. VERMA, S. CHOWDHURY, S. MUKHERJEE and S. KHOWALA (2009): Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Res. Intern.* 42, 577-587.
 16. ISILDAK, Ö., I. TÜRKEKUL, M. ELMASTAS and M. TÜZEN (2004): Analysis of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms from the Middle Black Sea region. *Food Chem.* 86, 547-552.
 17. ISILDAK, Ö., I. TURKEKUL, M. ELMASTAS and H. J. ABOUL-ENEIN (2007): Bioaccumulation of Heavy Metals in Some Wild-Grown Edible Mushrooms. *Anal. Letters* 40, 1099-1116.
 18. KALĀČ, P., J. BURDA and I. STAŠKOVÁ (1991): Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of a lead smelter. *Sci. Total Environ.* 105, 109-119.
 19. KALAC, P., L. SVOBODA and B. HAVLÍČKOVÁ (2004): Contents of detrimental metals mercury, cadmium and lead in wild growing edible mushrooms: a review. *Energ. Educ. Sci. Technol.* 13, 31-38.
 20. KALĀČ, P. (2009): Chemical composition and nutritive value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* 113, 9-16.
 21. KALĀČ, P. (2010): Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009. *Food Chem.* 122, 2-15.
 22. KAPAJ, S., H. PETERSON, K. LIBER and P. BHATTACHARYA (2006): Human health effects from chronic arsenic poisoning - a review. *J. Environ. Sci. Health A* 41, 2399-2428.
 23. KOYYALAMUDI, S. R., S. C. JEONG, C. H. SONG, K. Y. CHO, and G. PANG (2009): Vitamin D₂ formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. *J. Agricult. Food Chem.* 57, 3351-3155.
 24. LIU, H., J. ZHANG, T. LI, Y. SHI and Y. WANGBottom of Form (2012): Mineral Element Levels in Wild Edible Mushrooms from Yunnan, China. *Biol. Trace Element Res.* 147, 341-345.
 25. MALLIKARJUNA, S. E., A. RANJINI, D. J. HAWARE, M. R. VIJAYALAKSHMI, M. N. SHASHIREKHA and S. RAJARATHINAM (2013): Mineral Composition of Four Edible Mushrooms. *Journal of Chemistry* 2013. Dostuno na: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/805284>
 26. MATTILA, P., K. KÖNKÖ, M. EUROLA, J.-M. PIHLAVA, J. ASTOLA, L. VAHTERISTO, V. HIETANIEMI, J. KUMPULAINEN, M. VALTONEN and V. PIIRONEN (2001): Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. *J. Agricult. Food Chem.* 49, 2343-2348.
 27. MELGAR, M. J., J. ALONSO and M. A. GARCÍA (2009): Mercury in edible mushrooms and underlying soil: Bioconcentration factors and toxicological risk. *Science of the Total Environment* 407, 5328-5334.
 28. MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I., K. SOCHA, A. M. WITKOWSKA, M. E. ZUJKO and M. H. BORAWSKA (2013): Cadmium and Lead in Wild Edible Mushrooms from the Eastern Region of Poland's 'Green Lungs'. *Polish J. Environ. Stud.* 22, 1759-1765.
 29. MORRIS, M. C., D. A. EVANS, C. C. TANGNEY, J. L. BIENIAS and R. S. WILSON (2005): Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arch. Neurol.* 62, 1849-1853.
 30. NETRAVATHI, G. P., U. V. SATISHA, M. D. SHYLAJA, M. N. SHASHIREKHA and S. RAJARATHINAM (2006): Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J. Agricult. Food Chem.* 54, 9764-9772.
 31. OBA, K., M. KOBAYASHI, T. MATSUI, Y. KODERA and J. SAKAMOTO (2009): Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Cancer Res.* 29, 2739-2745.
 32. OĆIĆ, V. (2014): Uzgoj gljiva može biti unosan. *Gospodarski list* 27, 14-15.
 33. ROPI, O., J. MLCEK and T. JURIKOVA (2009): Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* 67, 624-631.
 34. SESLİ, E., M. TÜZEN and M. SOYLAK (2008): Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from Black sea region, Turkey. *J. Hazard. Mat.* 160, 462-467.
 35. SOYLAK, M., S. SARACOGLU, M. TÜZEN and D. MENDİL (2005): Determination of trace metals

- in mushroom samples from Kayseri, Turkey. Food Chem. 92, 649-652.
36. STIHL, C., C. RADULESCU, G. BUSUIOC, I.V. POPESCU, A. GHEBOIANU and A. ENE (2011): Studies on accumulation of heavy metals from substrate to edible wild mushrooms. Roman. J. Phys. 56, 257-264.
37. SVOBODA, L., K. ZIMMERMANNOVA and P. KALAČ (2000): Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. Sci. Total Environ. 246, 61-67.
38. SVOBODA, L., B. HAVLÍČKOVÁ and P. KALAČ (2006): Contents of cadmium, mercury and lead in edible mushrooms growing in a historical silver-mining area. Food Chem. 96, 580-585.
39. ŠIRIĆ, I., I. KOS, D. BEDEKOVIĆ, A. KAIĆ and A. KASAP (2014): Heavy metals in edible mushroom *Boletus reticulatus* Schaeff. collected from Zrin mountain, Croatia. Period. Biol. 116, 319-322.
40. TÜZEN, M. (2003): Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. Microchem. J. 74, 289-297.
41. VALVERDE, M. E., T. HERNANDEZ-PÉREZ and O. PAREDES-LÓPEZ (2015): Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. Int. J. Microbiol. 2015, Article ID 376387, 14 pages.
42. VETTER, J. (2003): Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom. Eur. Food Res. Technol. 217, 10-12.
43. WASSER, S. (2004): Shiitake (*Lentinula edodes*). In: Coates, P. M., Blackman, M., Cragg, G. M., White, J. D., Moss, J., Levine, M.A.: Encyclopedia of Dietary Supplements. CRC Press (653-664).
44. ZHÚ, F., L. QU, W. FAN, M. QIAO, H. HAO and X. WANG (2011): Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. Environ. Monitor. Assess. 179, 191-199.

Heavy Metal Contents in Three Cultivated Mushrooms Species

Nina BILANDŽIĆ*, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Bruno ČALOPEK, Grad. Food Technology Eng., Marija SEDAK, Grad. Food Technology Eng., Maja ĐOKIĆ, Grad. Chem. Technology Eng., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, Grad. Biotechnology Eng., Ivana VARENINA, Grad. Biotechnology Eng., Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ, Grad. Biotechnology Eng., Ines VARGA, Grad. Biotechnology Eng., Maja ĐOKIĆ, Grad. Chem. Technology Eng., Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia

In this study, three cultivated mushrooms species produced in Croatia were collected in the supply chain of the Zagreb region: champignon (*Agaricus bisporus*), oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and shiitake (*Lentinula edodes*). The concentrations of the toxic metals arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) were determined using inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS), and mercury (Hg) was determined by the mercury analyser. The metal content determined on the dry mass and moisture content in three mushrooms types was in the range of 91 to 92.3%. Metals were determined in the ranges (mg/kg dry mass): As 25.0-275.6, Cd 30.6-294.0, Hg 2-3, Pb 4.78-31.7. The highest mean values of metals were determined for (mg/kg dry mass): shiitake: Cd 274.8; oyster mushroom As 158.2, Pb 18.4, Hg 2.99. Significantly lower As concentrations were determined in shiitake mushrooms than in champignons and oyster mushrooms ($P<0.01$, both). Significantly higher Cd concentrations were measured in shiitake than in champignons and oyster mushrooms ($P<0.001$, both). A significantly

higher Pb content was determined in oyster mushrooms than in shiitake ($P<0.01$). To assess the risk of toxic metals in mushrooms, daily or weekly intake of these metals is calculated and compared with toxicological values of the provisional tolerable weekly intake (PTWI). Arsenic concentrations measured in the three mushroom types contribute to the PTWI values with 2.63 to 10.6%. The largest contribution to the PTWI for Cd of 109.9% was calculated for shiitake, while champignons and oyster mushrooms showed a contribution of 41.3 and 34.2%, respectively. Mercury and Pb levels measured for all three mushroom types contribute less than 1% to the PTWI values. It can be concluded that the consumption of these three types of mushrooms in large quantities poses no health hazard concerning the intake of As, Hg and Pb. However, given the measured Cd concentrations, consumption of large quantities of shiitake and their multiple weekly intake may pose a risk to consumers.

Key words: *Cultivated mushroom, Champignon, Oyster mushroom, Shiitake, Heavy metals, ICP-MS*

Kraj recesije u hrvatskom veterinarstvu?

Marko Tadić*, Vlasta Anić i Andelko Gašpar



Uvod

Prema podatcima Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske¹ o postupnom povećavanju društvenog bruto proizvoda tijekom godine 2015. te smanjivanju stope registrirane nezaposlenosti i povećavanju broja zaposlenih opravdano je pretpostaviti da hrvatsko gospodarstvo postupno izlazi iz višegodišnje recesije, odnosno gospodarske krize. Zarana smo upozorili (Tadić i Šimičić, 2006.) na nedostatnu ekonomičnost, produktivnost i rentabilnost veterinarskih organizacija u Republici Hrvatskoj te da je opravdano pretpostaviti pogoršavanje djelotvornosti poslovanja tih organizacija. Analizirajući ekonomski rezultate poslovanja veterinarskih stanica i odjelito veterinarskih ambulanata od 2003. do 2009. godine Tadić i sur. (2009.) navode da su se već u tom razdoblju očitovali znaci nadolazeće finansijske krize i recesije, a čelnici veterinarskih organizacija izjasnili su se, tijekom provedene anonimne ankete, da se recesiji kane suprotstaviti smanjivanjem broja zaposlenih, smanjivanjem plaća i proširivanjem (diversifikacijom) djelatnosti. Autori zaključuju da će dugotrajan ekstenzivan tip razvoja veterinarstva (masovnost, feminizacija, pauperizacija) otežati izlazak iz recesije. Tadić, (2012.) zaključuje, temeljem istraživanja rezultata poslovanja veterinarskih organizacija tije-

kom razdoblja 2003. do 2007. te 2008. do 2010. da se ubrzava i produbljuje recesija koja ima sve odlike depresije.² Tadić i sur. (2013.) navode rezultate istraživanja koji dokazuju da je recesija u veterinarstvu dublja od one u hrvatskom gospodarstvu te da su njezini uzroci endogene i egzogene naravi. Oni navode da su bitni egzogeni čimbenici „*duboke strukturne promjene u hrvatskoj poljoprivredi i prehrambenoj industriji te prilagodba pripadnim propisima i praksi u Europskoj uniji. Endogeni čimbenici poglavito su: propusti u pretvorbi i privatizaciji veterinarskih organizacija, usporena prilagodba veterinarstva strukturnim gospodarskim promjenama u Hrvatskoj, ubrzana etatizacija veterinarstva te osobito odsustvo sustavne politike na tržištu rada veterinara. Nesklad ponude i potražnje odnosno pretičak ponude nad potražnjom na tržištu rada veterinara zakonito vodi padu cijene rada veterinara, slabljenju njihovog ekonomskog položaja i društvenog ugleda što dugoročno ima vrlo negativne posljedice za veterinarsku profesiju u Hrvatskoj.*“

Materijali i metode

Predmetom istraživanja su rezultati poslovanja veterinarskih organizacija u Hrvatskoj između 2003. i 2014. godine.

² Recesija je samo jedna od faza gospodarske krize (stagnacija, recesija, depresija), a svaka faza iziskuje specifičnu (primjerenu) makroekonomsku politiku.

¹ <http://www.dzs.hr/> (Preuzeto 28.10.2015.)

Dr. sc. Marko TADIĆ*, dr. med. vet., redoviti profesor u mirovini (dopisni autor, e-mail: marko.tadic@zg.htnet.hr), Hrvatska; Vlasta ANIĆ, dr. med. dent., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska, dr. sc. Andelko GAŠPAR, dr. med. vet., Hrvatska veterinarska komora, Zagreb, Hrvatska

Oni se odnose na veterinarske stanice i veterinarske ambulante, odnosno samo na one veterinarske organizacije koje su obveznice dostavljanja godišnjih finansijskih izvješća Finansijskoj agenciji (FINA) - dionička društva (d.d.) i društva ograničene odgovornosti (d.o.o.). Valja naglasiti da je broj različnih veterinarskih organizacija koje se bave veterinarskom praksom (veterinarske ambulante, veterinarske stanice, veterinarske bolnice, veterinarske klinike, veterinarske prakse, veterinarske službe, ovlaštene veterinarske organizacije, kontrolna tijela)³ znatno veći od broja organizacija čije smo rezultate poslovanja istraživali.

Podatke o poslovanju veterinarskih organizacija preuzeli smo od Hrvatskog poslovnog portala Poslovna.hr (izdavač Bisnode d.o.o.)⁴ iz obrazaca POD-BIL, POD-RDG, POD-DOP s 302 pozicija od kojih smo, radi jednostavnosti za razumijevanje, koristili samo ove agregatne te poglavito kvalitativne pokazatelje:

- Broj zaposlenih
- Prosječna mjeseca neto plaća (€)
- Ukupni prihod (1.000 €)
- Koeficijent tekuće likvidnosti
- Koeficijent ubrzane likvidnosti
- Altman Z' Score
- Stupanj zaduženosti (%)
- Povrat na vlasnički kapital - ROE (%)
- Povrat na aktivu - ROA (%)
- Neto dobit po zaposlenom (€)
- Udio osobnih dohodaka u ukupnim rashodima (%)
- Vrijednost imovine po zaposlenom (€)

Pribrane podatke obradili smo pri-padnim statističkim metodama uporabom programa STATISTICA 12 te odgo-varajućim ekonometrijskim postupcima.

³ <http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=7> (Preuzeto 28.10.2015.; http://www.hvk.hr/hr/vet_org/index.htm (Preuzeto 28.10.2015.)

⁴ <http://www.poslovna.hr/subjekti.aspx?show=324299&srn=1&xt=ag>

Služili smo se i drugim metodama što se rabe u sličnim društvenim istraživanjima: analiza, indukcija, dedukcija, poredbena analiza, sinteza.

Rezultati

Godine 2003. 121 veterinarska organizacija bila je obvezna dostaviti godišnje finansijsko izvješće FINI. Godine 2014. takvih organizacija bilo je samo 108 ili 10,7% manje. Razvidno je da ih je 13 prestalo postojati. Proces prestajanja postojanja tih veterinarskih organizacija počinje godine 2009., odnosno vrlo brzo poslije pojave gospodarske recesije.

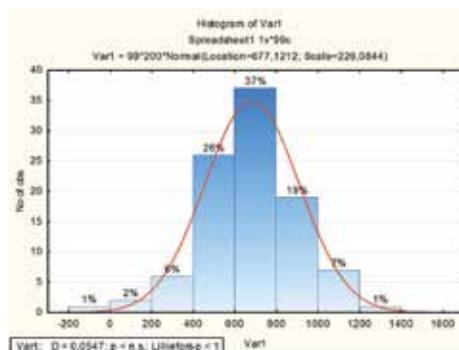
Prosječni broj zaposlenih po veterinarskoj organizaciji smanjen je s 15,2 u godini 2003. na 13,5 ili za 11,2%, a istodobno je ukupni broj zaposlenih u tim veterinarskim organizacijama smanjen s 1.839 na 1.458, odnosno za 20,7% kao posljedica smanjenja broja veterinarskih organizacija i prosječnog broja zaposlenih po organizaciji. Po tome su obilježju veterinarske organizacije male organizacije koje najčešće zapošljavaju između 3 i 5 radnika.

Ukupni prihod naznačenih organizacija, kao agregatni pokazatelj njihova poslovanja, povećan je u naznačenom razdoblju 2,33% i povrh smanjivanja broja organizacija i broja zaposlenih. Posljedica (rezultat) je to porasta ukupnog prihoda po organizaciji za 14,6% te po zaposlenom za 28,2%. Valja naznačiti da su ta povećanja ostvarena pretežito tijekom predrecesijskog razdoblja.

Ostvarena **prosječna mjeseca neto plaća** zaposlenih u veterinarskim organizacijama kvalitativni je pokazatelj djelotvornosti njihova poslovanja te produktivnosti zaposlenih. Ona je tijekom označenog razdoblja porasla za 6,6%, a najveća je bila godine 2009.⁵, a najmanja 2003. Po tome su obilježju veterinarske

⁵ Godina 2008. je godina „službenog“ priznavanja početka recesije u hrvatskom gospodarstvu.

organizacije relativno homogen skup ($V = 33,4\%$). Njihova je razdioba, prema tome obilježju, bila godine 2014. blago asimetrična ($\beta_1 = -0,139$) i spljoštena ($\beta_2 = 0,901$) i dobro se opisuje *normalnom razdiobom* ($P < 0,05$). U donjem centilu isplaćena neto plaća bila je manja od 433 €, a u gornjem veća od 990 € (Grafikon 1.)



Grafikon 1. Razdioba broja veterinarskih organizacija prema visini prosječne mjesecne neto isplaćene plaće (€) tijekom godine 2014.

Međuovisnost naznačenih promjenjivica (broj zaposlenih, ostvareni ukupni prihod, prosječna mjesecna neto plaća) razvidna je po naznačenim korelacijskim koeficijentima (Tabela 1) te kretanjima tijekom označenog razdoblja (Grafikon 2). Funkcije cilja poslovanja veterinarskih organizacija, kao i drugih poduzeća-poduzetnika, mogle bi biti: ukupni prihod, visina plaća, ostvarena neto dobit. Iz tabele

korelacijskih koeficijenata razvidna je značajna ($P < 0,05$) međuovisnost; ostvarenog ukupnog prihoda, visine isplaćene prosječne mjesecne neto plaće te vrijednosti imovine. Ostvarena neto dobit bila je jedino značajno ($P < 0,05$) ovisna o ostvarenom ukupnom prihodu.

Početak i tijek recesije zorno su vidljivi na grafikonu 2. Istodobno su vidljive i najvažnije posljedice recesije: smanjivanje broja veterinarskih organizacija i smanjivanje broja zaposlenih. Recesija počinje godine 2008., a prve znatnije posljedice očituju se tijekom 2009. godine.

Koeficijent tekuće likvidnosti pokazuje u kojoj mjeri kratkotrajna imovina poduzeća pokriva kratkotrajne obveze. Taj bi koeficijent trebao biti približno 2. Tijekom promatranog razdoblja prosječni koeficijent tekuće likvidnost veterinarskih organizacija bio je između 2,2 (2008. godine) i 6,93 (2010. godine). Ipak je četvrta veterinarskih organizacija svake godine imala taj koeficijent manji od 1,0. Godine 2014. takvih je organizacija bilo 46% što upozorava na znatne poslovne teškoće veterinarskih organizacija.

Na ozbiljne poteškoće u poslovanju veterinarskih organizacija upozorava i **koeficijent ubrzane likvidnosti** koji pokazuje sposobnost poduzeća da može svoje kratkoročne obveze pokriti (namiriti) onom imovinom koju je najjednostavnije pretvoriti u novac. On bi trebao biti barem 1 (omjer 1:1).

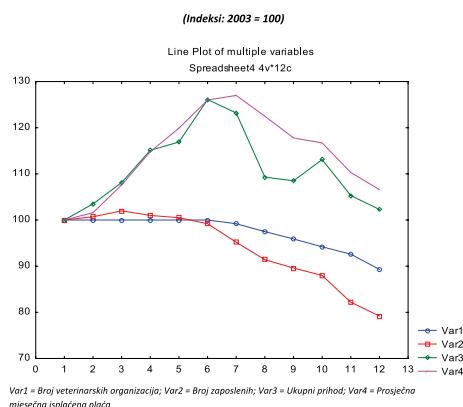
Tabela 1. Matrica korelacijskih koeficijenata

Variable	Correlations (Spreadsheet1) Marked correlations are significant at $p < 0,05$ N=12 (Casewise deletion of missing data)				
	Var1	Var2	Var3	Var4	Var5
Var1	1,000	0,301	0,002	-0,461	0,440
Var2	0,301	1,000	0,884	0,585	0,711
Var3	0,002	0,884	1,000	0,804	0,572
Var4	-0,461	0,585	0,804	1,000	0,195
Var5	0,440	0,711	0,572	0,195	1,000

Var1 = Ukupni broj zaposlenih; Var2 = Ukupni prihod (1000 €); Var3 = Isplaćena prosječna mjesecna neto plaća (€); Var4 = Vrijednost ukupne imovine (1000 €); Var5 = Ostvarena ukupna neto dobit (1000 €)

Likvidnost poduzeća ovisna je o brojnim čimbenicima, a posebno su značajni: pripadni propisi, poslovno okruženje te finansijska disciplina i poslovna etika. Likvidnost veterinarskih organizacija ozbiljno je ugrožavala finansijska nedisciplina naročito tijekom recesiskog razdoblja kada su se drastično produžili rokovi naplate potraživanja i bili su uvjek duži od rokova plaćanja obveze. Stoga su i potraživanja veterinarskih organizacija od „kupaca“ – korisnika usluga uvjek bila veća od obveza – dugova prema dobavljačima.

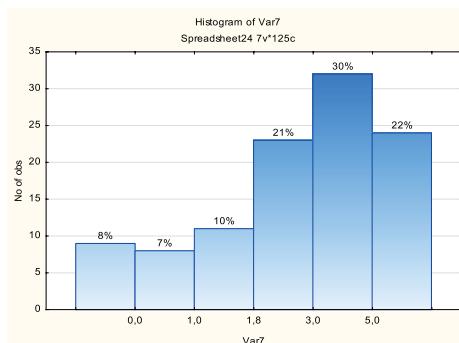
ALTMAN Z' SCORE je osobito značajan pokazatelj ekonomskog stanja poduzeća⁶. Tijekom promatranog razdoblja prosječni koeficijent bio je veći od 3.



Grafikon 2. Promjene broja veterinarskih organizacija, broja zaposlenih, ostvarenog ukupnog prihoda i prosječne mjesecne neto isplaćene plaće u veterinarskim organizacijama između 2003. i 2014. godine.

Treba upozoriti da je znatan broj veterinarskih organizacija koje su 2014. godine imale (ostvarile) taj koeficijent manji od 3 (Grafikon 3).

⁶ Altman Z' Score: Tvrtke kojima je koeficijent iznad 3 smatraju se zdravim tvrtkama i vjerojatno nećeći u stečajni postupak. Tvrtke s koeficijentima između 1,8 i 3,0 nalaze se u sivoj zoni.



Grafikon 3. Razdioba broja veterinarskih organizacija prema razini ALTMAN'Z-SCORE godine 2014.

Stupanj zaduženosti veterinarskih organizacija upozorava na njihovo „konzervativno“ poslovno ponašanje. Tijekom analiziranog razdoblja prosječna zaduženost veterinarskih organizacija bila je manja od 50% čak i tijekom recesiskog razdoblja. Godine 2014. samo četvrtina veterinarskih organizacija bila je zadužena više od 70%, što se drži ozbiljnom prijetnjom uspješnosti nastavka poslovanja.

Cilj poduzetničke aktivnosti je ostvarivanje profita na uloženi kapital kako na vlastiti tako i na predujmljeni. Prosječni godišnji povrat na vlasnički kapital (**ROE-Return On Equity**) veterinarskih organizacija bio je najmanji godine 2013. (4,91%), a najveći godine 2009. (18,3%) što je zoran dokaz da je recesija u veterinarstvu kasnila za onom u hrvatskom gospodarstvu i da je veterinarstvo počelo „izlaziti“ iz recesije prije nego li hrvatsko gospodarstvo. Razlike među veterinarskim organizacijama prema tom pokazatelju su znatne. Na jednoj strani su one koje posluju s gubitkom, a na drugoj one koje ostvaruju primjeren povrat na vlastiti kapital.⁷

⁷ ROE (ili stopa povrata na vlasnički kapital) pokazuje koliko novčanih jedinica dobiti poduzeće ostvaruje na jednu jedinicu vlastitog kapitala. ROE je dobar pokazatelj brzine rasta poduzeća jer se smatra da ukupni prihodi

Tabela 2. Ekonomска slika prosječne veterinarske organizacije u Hrvatskoj godine 2014.

Variable	Descriptive Statistics (Spreadsheet1)							
	Mean	Confidence -95,000%	Confidence 95,000%	Percentile 20,00000	Percentile 80,00000	Coef.Var.	Skewness	Kurtosis
Var1	13,50	10,87	16,1	3,00	22,00	101,99	1,465	1,39
Var2	626,50	572,53	680,5	472,00	822,00	44,94	-0,581	0,47
Var3	662,44	316,69	1008,2	88,80	751,20	273,61	8,580	81,80
Var4	22,48	11,89	33,1	-1,40	38,60	247,06	2,751	9,45
Var5	559,96	356,38	763,5	88,22	744,05	190,59	5,645	39,44
Var6	4,17	2,24	6,1	0,76	5,27	242,03	8,540	81,38
Var7	3,41	2,11	4,7	0,51	4,74	199,14	7,064	60,73
Var8	7,13	-0,20	14,5	1,40	5,35	536,56	10,251	105,69
Var9	46,03	35,39	56,7	14,00	68,00	121,20	4,090	22,65
Var10	9,54	4,52	14,6	-1,60	16,30	274,38	1,253	4,18
Var11	5,17	2,60	7,7	-0,50	12,10	260,30	0,947	4,76
Var12	1,40	0,69	2,1	0,07	3,74	252,77	0,004	3,21
Var13	38,27	34,95	41,6	26,00	52,60	45,31	-0,734	0,02
Var14	36,43	30,03	42,8	18,47	43,29	87,67	3,730	19,11
Var15	95,93	74,20	117,7	26,00	122,00	112,96	2,814	8,41
Var16	81,80	63,17	100,4	19,00	134,00	113,55	2,129	5,48
Var17	1,89	0,86	2,9	0,15	1,34	273,89	4,652	23,73

Var1: Broj zaposlenih; Var2: Prosječna mjesечna neto plaća (€); Var3: Ukupni prihod (u 1.000 €); Var4: Ukupna neto dobit (u 1.000 €); Var5: Vrijednost ukupne imovine (u 1.000 €); Var6: Koeficijent tekuće likvidnosti; Var7: Koeficijent ubrzane likvidnosti; Var8: Altman Z-Score; Var9: Stupanj zaduženosti (u %); Var10: Povrat na vlasnički kapital (ROE); Var11: Povrat na aktivu (ROA); Var12: Neto dobit po zaposlenom (u 1.000 €); Var13: Udio osobnih dohodataku u ukupnom prihodu (u %); Var14: Vrijednost imovine po zaposlenom (u 1.000 €); Var15: Prosječno vrijeme naplate potraživanja (dana); Var16: Prosječno vrijeme plaćanja dugova (dana); Var17: Omjer ukupnog duga i vlastitog kapitala

Povrat na aktivu (ROA-Return On Assets) mjerodavniji je pokazatelj uspješnosti poslovanja jer se odnosi na djelotvornost ukupno korištenog kapitala (vlastitog i predujmljenog). Veterinarske su organizacije tijekom analiziranog razdoblja ostvarivale prosječni povrat na aktivu između 0,29% (2013. godine) i 8,19% (2009. godine). Godine 2014. 70% veterinarskih organizacija nije ostvarilo nikakav ili pak manji od 10% povrat na aktivu. Očevidno je da veterinarske

ne mogu rasti po stopi većoj od trenutnog iznosa ROE, osim ukoliko ne dođe do novih zaduživanja. Smatra se da je ROE od 15% prosjek za dobro poduzeće. <http://www.poslovna.hr/subjekti.aspx?show=324299&tab=posl&stab=prikazi> (Preuzeto 11.11.2015.).

djelatnosti nisu osobito profitabilne djelatnosti.⁸

Ostvarena neto dobit po zaposlenom mogla bi biti funkcija cilja poduzetničke aktivnosti. Tijekom označenog razdoblja ona se u veterinarskim organizacijama postupno smanjivala, kao posljedica ekonomske krize, sve do 2013. godine. U projektu je bila skromna. Godine 2014. gotovo petina veterinarskih organizacija nisu ostvarile nikakvu dobit, a njih dvije trećine ostvarile su neto dobit po zaposlenom manju od 5.000 €. Zanimljivo je da nismo ustanovili značajniju korelaciju između ostvarene neto dobiti po zapo-

⁸ Visinu tog pokazatelj treba uvijek uspoređivati s kamatnim stopama na kredite.

slenom i broja zaposlenih ili ostvarenog ukupnog prihoda ili vrijednosti imovine veterinarske organizacije. Stupanj zaduženosti veterinarskih organizacija negativno utječe na visinu ostvarene dobiti ($r = 0,404$; $P < 0,05$).

Zanimljivo je naglasiti da su udjeli **troškova osoblja u ukupnim rashodima** veterinarskih organizacija bili iznenađujuće relativno niski. Gotovo tri četvrtine veterinarskih organizacija imale su te troškove manje od 50% ukupnih rashoda i po tome su obilježju one relativno homogen skup. To ukazuje na pozitivnu tendenciju da veterinarske usluge sve više postaju „kapitalno intenzivne“ i da se sve više diversificiraju.

Prosječna **vrijednost imovine veterinarskih organizacija** obračunana po zaposlenom nije se bitno mijenjala tijekom promatranog razdoblja i bila je između 33 i 41 tisuća €. Iako su razlike među veterinarskim organizacijama, po tome obilježju znatne, one su ipak, s ekonomskog motrišta, u prosjeku, male organizacije (Tabela 2).

Raspis

Postupno se nazire kraj gospodarske recesije u Hrvatskoj koja je trajala znatno duže nego u većini europskih država, poglavito zbog nespremnosti i/ili nesposobnosti provođenja bitnih gospodarskih reformi. Recesija je zahvatila i veterinarstvo. Povrh općih čimbenika koji su prouzročili gospodarsku recesiju ona je u veterinarstvu bila prouzročena i krupnim društveno-ekonomskim promjenama u poljoprivredi i prehrambenoj industriji, dugim razdobljem pristupanja Hrvatske Europskoj uniji, postupnim reduciranjem veterinarskih djelatnosti te „ekstenzivnim tipom razvoja veterinarstva“ u minulim desetljećima.

Veterinarske su organizacije na recesiju odgovorile ponajprije smanjivanjem broja zaposlenih te

racionalizacijom troškova poslovanja i stanovitom diversifikacijom djelatnosti. Različiti izvori donose različite podatke o broju zaposlenih veterinara (doktora veterinarske medicine). OIE –World Organisation for Animal Health izvješćuje da je u Hrvatskoj godine 2014. bilo 2.157 zaposlenih veterinara od kojih 38,6% u „javnom sektoru“.⁹ Hrvatski zavod za zapošljavanje¹⁰ donosi podatak o 2.279 zaposlenih veterinara na početku 2013. godine u 39 različnih djelatnosti, odnosno 0,2% svih zaposlenih u Hrvatskoj. Od tog broja u veterinarskim djelatnostima bilo je zaposleno 51,1%. Najviše ih je bilo zaposleno u Gradu Zagrebu 38,0%, Zagrebačkoj županiji 8,05%, Osječko-baranjskoj županiji 7,31% te Koprivničko-križevačkoj županiji 6,93%. Stopa zaposlenosti bila je 67,28% što se svrstava u „visoku zaposlenost“. Broj registriranih nezaposlenih veterinara od 2004. do 2015. godine bio je između 85 i 178, a izrazito se povećavao tijekom recesijskog razdoblja (2009.-2014.).¹¹

Uspoređujući podatke o promjenama broja zaposlenih u veterinarskim organizacijama, prosječne mjesечne neto isplaćene plaće, ostvarenog ukupnog prihoda, vrijednosti ukupne imovine i ostvarene ukupne neto dobiti razvidno je da su veterinarske organizacije tijekom recesijskog razdoblja osobito „štitele“ visinu plaća. Posve je to očekivano jer su u veterinarskim organizacijama najčešće u istoj osobi „poduzetnik-menadžer-radnik“. Analizirajući produktivnost rada tijekom tog razdoblja ustvrdili smo da se ona nije smanjivala, dapače usporedio sa smanjivanjem broja zaposlenih povećavao se ostvareni ukupni prihod što je dokaz

⁹ http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/CountryInformation/Veterinarians (Preuzeto 20.07.2015)

¹⁰ <http://statistika.hzz.hr/Statistika.aspx?tipIzvjestaja=2> (Preuzeto 16.11.2015.)

¹¹ Opravdano bi bilo očekivati da Hrvatska veterinarska komora ima podrobne podatke o doktorima veterinarske medicine u Hrvatskoj.

da je u veterinarskim organizacijama bio znatan broj zaposlenih čija je marginalna produktivnost rada bila ravna ništici (*prikrivena nezaposlenost*).

O nedostatnoj produktivnosti rada u veterinarskim organizacijama zorno svjedoči podatak o prosječnoj mjesecnoj isplaćenoj neto plaći u veterinarskim organizacijama koja je godine 2014. bila 13,6% manja od prosječne mjesecne neto isplaćene plaće po zaposlenom u Hrvatskoj ili 3,6% manja nego u djelatnostima *poljoprivrede, šumarstva i ribarstva*, 32,5% manja nego u *stručnim, znanstvenim i tehničkim* djelatnostima, 20,7% manja nego u djelatnostima *javne uprave i obrane*, 12,3% manja nego u djelatnosti *obrazovanja* ili pak 21,7% manja nego u djelatnostima *zdravstvene zaštite*.¹² Očejidno je da u veterinarskim organizacijama još uvijek dominira „naslijedeni“ oblik ekstenzivnog zapošljavanja. Posredno o tome svjedoči vrijednost imovine koja je u veterinarskim organizacijama godine 2014. Iznosila 4,21 godinu troškova rada (kapital:rad)¹³.

Izvjesno je da će se nesklad ponude i potražnje na tržištu rada veterinarima (nesklad ponude i potražnje na tržištu veterinarskih usluga) nastaviti barem u srednjoročnom razdoblju i da će stopa novog zapošljavanja veterinarima biti manja od stope zamjene, a to će i nadalje smanjivati prosječnu cijenu rada veterinarima i **negativno utjecati na društveni ugled veterinarske profesije u Hrvatskoj.**

Podrobnija analiza kvalitativnih pokazatelja djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija (Altman Z'Score, stopa povrata na vlastiti kapital (ROE), stopa povrata na aktivu (ROA) upozorava da je ozbiljno ugrožena

opstojnost znatnog broja veterinarskih organizacija: četvrtina ih je godine 2014. imala Altman Z'Score manji od 1,67, a njih 50% stopu povrata na vlastiti kapital manju od 4,3% te stopu povrata na aktivu manju od 2,5% što upozorava na vrlo nisku rentabilnost poslovanja i profitabilnost uporabe kapitala.¹⁴

Temeljem rezultata istraživanja opravданo je pretpostaviti da će se nastaviti tendencija smanjivanja broja veterinarskih organizacija i broja zaposlenih te koncentracija rada i kapitala u veterinarskim organizacijama. Postupno napuštanje ekstenzivnog modela razvoja veterinarskih organizacija je nužnost i mijenjanje funkcije cilja poslovanja, odnosno postavljanjem *dobiti na aktivu* za funkciju cilja kako bi se omogućilo kapitalno intenziviranje veterinarskih usluga što je suvremena tendencija u modernom veterinarstvu.

Sažetak

Predmetom istraživanja bilo je poslovanje veterinarskih organizacija u Hrvatskoj od 2003. do 2014. godine, a posebice tijekom recesiskog razdoblja. Istraživanje se odnosiло на one veterinarske organizacije koje су bile obvezne dostavljati godišnja finansijska izvješća Financijskoj agenciji (FINA). Za podrobnu analizu korišteno je 12 pokazatelja, a podatci su obrađeni primjereno statističkim i ekonometrijskim metodama. Korištene su i druge metode istraživanja što se ubičajeno rabe u društvenim istraživanjima. Rezultati istraživanja pokazuju da se recesija u veterinarstvu počela znatnije očitovati tijekom 2009. godine, a ozbiljne naznake prestanka recesije (izlaska iz recesije) očitovale su se tijekom 2014. godine. Bila je to recesija s „duplim dnom“. Tijekom recesiskog razdoblja došlo je do smanjivanja broja veterinarskih organizacija i broja zaposlenih. I povrh recesije nije došlo

¹² Slika bi bila još nepovoljnija kada bi se u obzir uzela kvalifikacijska struktura zaposlenih u naznačenim djelatnostima.

¹³ Podrobnije vidjeti: Piketty, T. (2014.): Kapital u dvadeset prvom stoljeću. Profil, Zagreb.

¹⁴ Ponderirana kamatna stopa Hrvatske narodne banke na sve kunske kredite s valutnom klauzulom bila je u siječnju 2014. 6,99%. <http://www.hnb.hr/monet/hmonet.htm> (Preuzeto 19.11.2015.)

do smanjivanja nominalnih plaća zaposlenih. U veterinarskim organizacijama dominira je ekstenzivan tip razvoja: znatna „prikrivena nezaposlenost“, niska ekonomičnost, produktivnost i rentabilnost poslovanja. To je uvjetovalo relativno niske (ispodprosječne) neto plaće u veterinarskim organizacijama što je imalo negativan utjecaj na društveni ugled veterinarske profesije u Hrvatskoj.

Ključne riječi: *veterinarske organizacije, gospodarska recesija, djelotvornost poslovanja, ekonomski položaj*

Literatura

1. TADIĆ, M. i J. ŠIMIČIĆ (2006): Društveni ugled veterinarske profesije i ekonomski položaj veterinarstva u Republici Hrvatskoj. *Vet. stn.* 37, 15-23.
2. TADIĆ, M., V. TADIĆ, D. CVITKOVIĆ, M. PAVLAK i V. ANIĆ (2009): Recesija i veterinarstvo. *Vet. stn.* 40, 337-351.
3. TADIĆ, M. (2012): Posljedice recesije u hrvatskom veterinarstvu. *Vet. stn.* 43, 69-75.
4. TADIĆ, M., V. ANIĆ i M. PAVLAK (2013): Razdoblje recesije u hrvatskom veterinarstvu. *Vet. stn.* 44, 1-9.

The End of Recession in Croatian Veterinary Medicine?

Marko TADIĆ, DVM, PhD, Full Professor in Retirement, Croatia; Vlasta ANIĆ, DDM, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Andelko GAŠPAR, DVM, PhD, Croatian Veterinary Chamber, Zagreb, Croatia

The subject of the survey was to determine the functioning of veterinary organizations in Croatia from 2003 to 2014, with an emphasis on the recession period. The survey was conducted on veterinary organizations required to submit annual financial reports to the Financial Agency (FINA). A total of 12 indicators were used for a thorough analysis, and the data were processed using adequate statistical and econometric methods. Other common research methods in social surveys were also applied. The survey results indicated that the recession started having significant effects during 2009, and clearer signs of the end of recession appeared during 2014. It was a recession with

“double bottom”. During the recession period, the number of veterinary organizations and employees decreased, however, nominal employee wages did not decrease. The extensive type of development dominated in veterinary organizations: significant “hidden unemployment”, low efficiency, productivity and profitability of business activities. This resulted in relatively low (below average) net wages in veterinary organizations, which had a negative effect on the social status of the veterinary profession in Croatia.

Key words: *Veterinary organizations, Economic recession, Efficiency of business activities, Economic position*

XXL ZAŠTITA!



Ataxxa®

permetrin, imidakloprid
spot-on solucija za pse



NE PRIMJENJIVATI MAČKAMA



Vaš izbor zaštite protiv buha i krpelja

Sadržaj 0,4 ml pipeta sadrži 200 mg permetrina i 40 mg imidakloprida. 1,0 ml pipeta sadrži 500 mg permetrina i 100 mg imidakloprida. 2,5 ml pipeta sadrži 1250 mg permetrina i 250 mg imidakloprida. 4,0 ml pipeta sadrži 2000 mg permetrina i 400 mg imidakloprida. **Indikacije** Za liječenje i sprječavanje infestacije buhami (*Ctenocephalides felis*). Buhe na psima ugibaju unutar jednog dana nakon primjene. Jedna primjena sprječava nove infestacije buhami tijekom četiri tjedna. Veterinarsko-medicinski proizvod (VMP) se može koristiti kao dio strategije liječenja alergijskog dermatitisa uzrokovanih buhami (FAD). VMP omogućuje neprekidnu akaricidnu učinkovitost protiv infestacija krpeljima (*Rhipicephalus sanguineus* i *Ixodes ricinus*) tijekom četiri tjedna, a *Dermacentor reticulatus* tijekom tri tjedna. Moguće je da krpelji, koji su već pričvršćeni na psu, ne uginu unutar dva dana nakon primjene VMP-a te mogu ostati pričvršćeni i vidljivi. U vrijeme primjene VMP-a preporučuje se uklanjanje nepričvršćenih krpelja na psu, kako bi se sprječilo da se pričvrste i počnu hranići krviju. **Ciljne vrste životinja** Psi. **Kontraindikacije** Zbog nedostatka odgovarajućih podataka, VMP se ne smije primjenjivati stenadi mlađoj od 7 tjedana ili lakšoj od 1,5 kg. VMP se ne smije primjenjivati u slučaju preosjetljivosti na djelatne tvari ili na bilo koju pomoćnu tvar. VMP se ne smije primjenjivati mačkama.

Samо za liječenje životinja. Prijе uporabe pročitati kompletan uputu u lijeku.

KRKA-FARMA d.o.o.
Radnička cesta 48, 10000 Zagreb
www.krka-farma.hr

 KRKA

Naša inovativnost i znanje
za djelotvorne i neškodljive
proizvode vrhunske kakvoće.

Enrotron 100 mg/ml

Otopina za injekciju za
goveda i svinje

ANIMEDICA

Što je Enrotron?

- Enrotron je injekcijski proizvod čija je aktivna tvar enrofloksacin, veterinarima dobro poznat fluorokinolon, koji se uspješno koristi u veterinarskoj praksi širom svijeta.

Enrotron 100 mg/ml, otopina za injekciju za goveda i svinje.

Sastav: 1 ml sadržava 100 mg djelatne tvari Enrofloksacina i 30 mg pomoćne tvari 1-Butanola.

Indikacije:

Goveda - Bolesti dišnog i probavnog sustava uzrokovane bakterijama i mikoplazmama (npr. pastereliza, mikoplazmoza, kolibaciloza, koliseptikemija i salmoneloze) i sekundarne bakterijske infekcije koje uslijede nakon virusnih infekcija (npr. virusna upala pluća), gdje kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma uzročnika, upućuje da je enrofloksacin lijek izbora. Liječenje lokalnih znakova (upala, kvaliteta i količina mlijeka) pridruženih perakutnom/akutnom mastitisu mlijenih krava u laktaciji uzrokovanih s E.coli, gdje povijest stada i raniji nalazi antibiograma upućuju da je enrofloksacin lijek izbora.

Svinja - Bolesti dišnog i probavnog sustava uzrokovane bakterijama i mikoplazmama (npr. pastereliza, mikoplazmoza, kolibaciloza, koliseptikemija i salmoneloze) i multifaktorske bolesti, kao što su atrofični rinitis i enzootička pneumonija, gdje kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma uzročnika, upućuje da je enrofloksacin lijek izbora.

Doze: Pročitati uputu o VMP prije primjene.

Primjena tijekom graviditeta, laktacije ili nesenja: Može se primjenjivati tijekom graviditeta i laktacije.

**PROČITATI UPUTU O VMP
PRIJE PRIMJENE**

Enrotron

Injekcijska otopina enrofloksacina
100 mg/ml

☒ Višestruke indikacije

☒ Kratka karenca za meso i mlijeko

☒ Različite mogućnosti aplikacije
(s/c, i/m, i/v)

☒ Ekonomičnost

Enrotron 100 mg/ml

Goveda, s/c:	meso i iznutrice
	12 dana
	mlijeko - 4 dana
Goveda, i/v:	meso i iznutrice
	5 dana
	mlijeko - 3 dana
Svinje, i/m:	meso i iznutrice
	13 dana

**CIJENA
90,00 kn**

**U SVIM BOLJIM
VELEDROGERIJAMA**

Utjecaj pariteta i tjelesne kondicije na određene biokemijske pokazatelje seruma mliječnih krava

Branimira Špoljarić*, G. Štibrić, S. Vince, J. Grizelj, M. Samardžija, T. Dobranić, I. Folnožić, Maja Popović, Zlata Flegar Meštrić i D. Gereš



Uvod

Biokemijskim pretragama kriji se ustanoviti bolesti, poremetnje metabolizma i nedostatke nutrijenata kod životinja (Otto i sur., 2000.). Laboratorijskim analizama krvi mogu se dobiti važni podatci koji omogućuju nadzor nad zdravljem mliječnih krava, kako individualno tako i u samom stаду (Cozzi i sur., 2011.). Da bi se ustanovilo odstupanje od normalnih, fizioloških vrijednosti u nekom stадu, potrebno je dobivene nalaze usporediti s prosjekom i rasponom vrijednosti promatranih pokazatelja u populaciji (Herdt, 2000.). Mnogi od ovih intervala ustanovljeni su općenito za goveda, ali bez razlike između mliječnih i mesnih pasmina (Russell i Roussel, 2007.), a uglavnom se odnose na vrijednosti životinja u suhostaju. Poznato je da na proizvodnju mlijeka utječu čimbenici poput pariteta, stadija laktacije te godišnjeg doba. Može se očekivati da ti faktori utječu i na krvne pokazatelje u

klinički zdravih krava u laktaciji (Cozzi i sur., 2011., Van Saun, 2000.).

Cilj našeg istraživanja bio je ustvrditi vrijednosti određenih biokemijskih pokazatelja u krvi, kao dijela metaboličkog profila, mliječnih krava na jednoj farmi u Hrvatskoj i usporediti ih s referentnim vrijednostima Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Namjera nam je bila ispitati utjecaj pariteta i tjelesne kondicije na promatrane pokazatelje.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na farmi mliječnih krava „Zdenačka farma d.o.o.“ u Velikim Zdencima u sklopu istraživanja učinkovitosti indukcijskih protokola u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta „Smanjena plodnost mliječnih krava“. U istraživanju je sudjelovalo 30 krava Holštajn-frizijske pasmine u dobi od 2 do 5 godina od

Dr. sc. Branimira ŠPOLJARIĆ*, dr. med. vet., viša asistentica, (dopisni autor, e-mail: bzevrnja@gef.hr), dr. sc. Silvijo VINCE, dr. med. vet., docent, dr. sc. Juraj GRIZELJ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Tomislav DOBRANIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Ivan FOLNOŽIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Darko GERES, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Goran ŠTIBRIĆ, dr. med. vet., „Zdenačka farma d.o.o.“, Veliki Zdenci, Hrvatska; dr. sc. Zlata FLEGAR MEŠTRIĆ, izvanredna profesorica, spec. medicinske biokem., znanstvena savjetnica, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

55. dana laktacije nadalje s prosječnom mlijecnošću od 7797,89 kg mlijeka u 305 dana laktacije. Krave su držane na dubokoj stelji i hranjene mješavinom koncentrata u količini da zadovolji i nadmaši dnevne potrebe, ovisno o mlijecnosti. Svim kravama je tijekom postupaka indukcije pet puta uzimana krv venepunkcijom repne vene u biokemijske epruvete s dodatkom aktivatora ugruška (Venosafe® plastic tube: Serum VF- 076SP, 7 mL, Terumo Europe N. V., Belgija), uvijek u isto vrijeme po završetku mužnje. Nakon vađenja, krv je neko vrijeme (do 3 sata) stajala na sobnoj temperaturi, a potom je centrifugirana 10 min. na 3500 okretaja. Serum je zatim odliven i spremljen u ependorf kivete na -20 °C do daljnje analize. Biokemijski pokazatelji, pokazatelji energetskog i metabolizma bjelančevina te enzimi i jetreni markeri (ukupne bjelančevine, albumini, ureja, kreatinin, glukoza, ukupni kolesterol, bilirubin, aspartat aminotransferaza- AST, alanin aminotransferaza- ALT i gama glutamil transferaza- GGT) određivani su standardnim kitovima (Beckman Coulter, Irska) na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680 u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu.

Na početku istraživanja svim je kravama određena tjelesna kondicija (Engl. *body condition score*, BCS) u skladu sa sustavom osjenjivanja od 1 od 5 bodova i porastom od 0,25 prema Edmonson i sur. (1989.). Za potrebe analize podataka, krave su podijeljene u dvije skupine: visoki BCS, ukoliko je bio iznad 2,5; a niski ukoliko je bio ispod ili jednak 2,5. Podaci o paritetu i mlijecnosti su provjereni u programskom paketu za management stada i mlijecnosti Westfalia DairyPlan C21 i krave su podijeljene u dvije skupine: primipare (jedno teljenje) i multipare (2 i više teljenja).

Statistička analiza podataka načinjena je pomoću programskog paketa

SAS (Statistical Analysis Software) 9.3. (2002-2008 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika (srednja vrijednost, 95% interval pouzdanosti) načinjena je pomoću SAS modula PROC MEANS i PROC FREQ. Za analizu koncentracije metaboličkih pokazatelja korišten je generalni linearni mješoviti model (PROC GLIMMIX). Statistički model je uključivao fiksne efekte pariteta, tjelesne kondicije i njihovih međusobnih križanja. U model je uključen i identificijski broj (ID) krave s ponavljajućim mjeranjima tijekom vremena pomoću naredbe RANDOM i opcije RESIDUAL. Odluka o tome koji tip strukture varianca-kovarijanca će biti upotrijebљen u analizi donesena je na osnovu SAS-ovih kriterija za evaluaciju najboljeg modela (AIC i BIC). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti (Engl. *Least square means*, LSM) i 95 %-tni interval pouzdanosti (Engl. *Confidence limits*, CL), a izračunati su metodom najmanjih kvadrata (Engl. *Least squares means*, LSM) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke signifikantnosti $P < 0,05$. Ponekad je u modelu usporedbe srednjih vrijednosti najmanjih kvadrata korištena opcija SLICE kada je bilo potrebno specificirati interakcije pojedinih fiksnih učinaka.

Rezultati i rasprava

Cilj istraživanja bio je utvrditi vrijednosti određenih biokemijskih pokazatelja u krvi mlijecnih krava na jednoj farmi u Hrvatskoj i usporediti ih s referentnim vrijednostima Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Namjera je bila ispitati i utjecaj pariteta i tjelesne kondicije na promatrane pokazatelje. Kod ocjenjivanja tjelesne kondicije, ocjena 2,5 je odabrana kao granična jer predstavlja minimalnu potrebnu kondiciju za

krave na vrhuncu laktacije, 30 do 100 dana postpartalno, koja je preduvjet za uspješnu plodnost (Carvalho i sur., 2014.), dok su s obzirom na paritet krave podijeljenje na primipare (jedno teljenje) i multipare (dva i više teljenja).

Pokazatelji energetskog i metabolizma bjelančevina (ukupne bjelančevine, albumini, ureja, kreatinin i glukoza)

Iz Tabele 1. je vidljivo kako je srednja vrijednost ukupnih bjelančevina malo povišena u odnosu na referentne vrijednosti te da su vrijednosti albumina vrlo blizu gornjoj referentnoj vrijednosti za krave. Nadalje, koncentracija ukupnih bjelančevina značajno je viša kod krava s nižom ocjenom tjelesne kondicije ($P=0,0492$) u odnosu na krave s ocjenom tjelesne kondicije višom od 2,5, dok je kod krava koje su se telile dva i/ili više puta koncentracija ukupnih bjelančevina viša, ali s tendencijom da bude statistički značajno različita ($P=0,0656$) u odnosu na krave koje su se telile samo jednom. No, bez obzira na tjelesnu kondiciju i paritet, koncentracija ukupnih bjelančevina je blago povišena u odnosu na referentne vrijednosti. S obzirom da se proteini sintetiziraju u jetri, njihova povećana koncentracija može upućivati na neke kronične promjene, napose ako je riječ o porastu globulinske frakcije (Allison, 2012.). Tome u prilog govore i povišene vrijednosti ukupnih bjelančevina u serumu kod multiparih i krava s lošijom tjelesnom kondicijom kod kojih dolazi do veće mobilizacije tjelesnih rezervi. Ovi rezultati za ukupne bjelančevine u skladu su s rezultatima Adrien i sur. (2012.) te Blum i sur. (1983.), koji navode kako starije krave imaju višu koncentraciju ukupnih bjelančevina od mlađih krava. No, za razliku od naših rezultata, kod navedenih autora krave s boljom tjelesnom kondicijom imale su višu koncentraciju ukupnih bjelančevina nego krave sa slabijom tjelesnom kondicijom. Koncentracija

albumina je unutar fiziološkog raspona, ali je značajno viša kod krava s ocjenom tjelesne kondicije iznad 2,5 ($P=0,005$) i kod primiparih krava ($P=0,0170$). Proteini plazme, uključujući albumine, su u ravnoteži s aminokiselinama i tkivnim bjelančevinama. Albumini se sintetiziraju u jetri i održavaju normalan osmotski tlak u cirkulaciji. Snižena razina albumina je karakteristična za bolesti jetre, bubrega, upalna stanja i pothranjenost. Koncentracija albumina pada s progrediranjem zamašćenja jetre. Međutim, sama koncentracija albumina u serumu nije dovoljan dijagnostički pokazatelj, jer im na koncentraciju mogu utjecati upalne i druge bolesti jetre (Lager i Jordan, 2012.).

Iz Tabele 1. vidljivo je kako su srednje vrijednosti koncentracije glukoze i kreatinina unutar fiziološkog raspona za krave, dok je koncentracija ureje blago povišena. Zbog fino reguliranih homeostatskih mehanizama Hoff i Duffield (2015.) vrijednost koncentracije glukoze u krvi smatraju nedovoljno osjetljivim pokazateljem energetskog statusa, osim u slučajevima hipoglikemije kao posljedice manjka ugljikohidrata ili udjela škroba u krmivu (Lager i Jordan, 2012.). Vrijednosti ureje u krvi kod preživača s očuvanom funkcijom bubrega indirektno ukazuju na buražni amonijak. Naime, povećana koncentracija ureje ukazuje na pretjeran unos bjelančevina hranom i nedovoljno izbalansiranu hranidbu (Hoff i Duffield, 2015.), odnosno kod deficitarnog energetskog statusa, produkcija amonijaka iz sirovog proteina u buragu nadmašuje kapacitet buražne mikroflore za pretvorbu tog amonijaka u mikrobni dušik, a cirkulirajući se amonijak u jetri pretvara u ureju (Carlson i Pehrson, 1994.). Stoga je porast koncentracije ureje postpartalno kod primiparih krava nagliji nego kod multiparih i pozitivno korelira s mlijekočnošću. Kod multiparih krava ureja je uglavnom u negativnom koreacijskom odnosu s tjelesnom kondicijom bez obzira na mli-

ječnost (Wathes i sur., 2007.). Uredne vrijednosti ureje upućuju na izbalansiranu hranidbu i dostatan unos bjelančevina (Ježek i sur., 2013.). U ovom istraživanju krave s ocjenom tjelesne kondicije iznad 2,5 imaju značajno povišene vrijednosti kreatinina u odnosu na krave s nižim BCS-om ($P=0,0196$). Cozzi i sur. (2011.) navode kako je za vrijeme ljetnih mjeseci povišena koncentracija kreatinina, kao posljedica pojačanog katabolizma aminokiselina zbog utjecaja toplinskog stresa, a pojačani katabolizam bjelančevina može objasniti i povišenu renalnu aktivnost. U našem slučaju, vrijednosti kreatinina, iako više kod krava s boljim BCS-om, su ipak unutar fizioloških granica.

Enzimi i jetreni markeri (bilirubin, kolesterol, ALT, AST i GGT)

U Tabeli 2. vidljivo je kako je prosječna koncentracija kolesterola malo iznad gornje granice fiziološkog raspona. S obzirom na tjelesnu kondiciju, koncentracija kolesterola se ne razlikuje u odnosu na ocjenu iste, dok je kod primiparih krava koncentracija kolesterola značajno viša ($P=0,004$) nego kod multiparih krava. Prema Rossato i sur. (2001.) metabolizam starijih krava lakše se adaptira na energetske promjene i koncentracija se kolesterola ustabili prije nego kod mlađih životinja. Stoga se povišena koncentracija kolesterola može smatrati mjerom za funkciju jetre u sintezi lipoproteina vrlo niske gustoće (Engl. *Very low density lipoproteins, VLDL*) (Lager i Jordan, 2012.), tim više što se masna jetra očituje sniženim koncentracijama kolesterola, jer oštećena jetra nije u stanju sintetizirati lipoproteine (Van Saun, 2000.). U našem su istraživanju primipare krave imale povišenu koncentraciju kolesterola, dok je kod multiparih krava ona bila u fiziološkim granicama. Osim toga, pokazano je kako koncentracija kolesterola raste s trajanjem laktacije (Blum i sur., 1983., Cozzi i sur., 2011.), vjerojatno zbog promjena u

koncentraciji serumskog lipoproteina tijekom laktacije (Raphael i sur., 1973.). Neposredno poslije porođaja dolazi do velike mobilizacije masti kako bi se osigurala dovoljna količina energije za mlijecnost, a tu mast prenose VLDL, koji su u velikoj mjeri građeni od kolesterola. Stanje jetre se, osim praćenjem aktivnosti enzima, može procjenjivati i pomoću koncentracije ukupnog bilirubina u serumu. Međutim, on je bolji pokazatelj problema s protokom žući nego li samim oštećenjima jetre (Van Saun, 2000.). Iz Tabele 2. je vidljivo da je vrijednost bilirubina u fiziološkim granicama, iako je kod krava s tjelesnom kondicijom ispod 2,5 značajno niža ($P=0,0199$) nego u krava s ocjenom iznad 2,5.

Od ostalih ispitivanih jetrenih markera i enzima, Tabela 2. pokazuje kako su vrijednosti ALT i AST iznad fiziološkog raspona, dok je koncentracija GGT nešto ispod gornje fiziološke granice. S obzirom na paritet i tjelesnu kondiciju, nema razlike u koncentraciji AST i GGT, dok je koncentracija ALT viša u krava s tjelesnom kondicijom ispod 2,5 s tendencijom da bude statistički značajno različita ($P=0,0893$). ALT, AST i GGT su enzimi koji najvišu aktivnost pokazuju u jetri i često se određuju da bi se ustanovila akutna i kronična oboljenja jetre (Stojević i sur., 2005.).

Dok se porast koncentracije AST i GGT najčešće veže sa sindromom masne jetre (Cebrä i sur., 1997.), prema Forenbacheru (1993.) aktivnost ALT u jetrenim stanicama preživača nije visoka te sam porast aktivnosti tog enzima u stanjima oštećenja jetre nije značajan. Prema Kaneko i sur. (1997.) povećana aktivnost AST je uobičajen nalaz kod krava u laktaciji s lezijama na jetri, posljedično velikoj mobilizaciji lipida u vrijeme negativnog energetskog statusa, posebice u visoko mlijecnih krava s tri ili više laktacija. Poput kolesterola, i koncentracija drugih pokazatelja, posebice enzima, a među njima AST

Tabela 1. Koncentracija ukupnih bjelančevina, albumina, ureje, kreatinina i glukoze u krvu krava od 55. dana laktacije prikazana kao srednja vrijednost i 95% interval pouzdanosti (Engl. *Confidence limits*, CL); referentne vrijednosti ispitivanih pokazatelja sukladno Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te vrijednosti ispitivanih pokazatelja ovisno o tjelesnoj kondiciji i paritetu, prikazane kao srednja vrijednost i 95% CL (vrnjetost označene istim slovima statistički se značajno razlikuju: ^a P=0,0492; ^c P=0,05, ^d P=0,0170; ^e P=0,0196; ili pokazuju tendenciju da budu statistički značajno različite, ^b P=0,0656)

Pokazatelj	Srednja vrijednost	95% CL	Ref. vrijednost Laboratorija	BCS ≤ 2,5			BCS > 2,5			primipare			multipare		
				LSM	95% CL	LSM	95% CL	LSM	95% CL						
ukupne bjelančevine (g/L)	80,09	77,92-82,26	60-80	85,03 ^a	79,94-90,30	80,39 ^a	76,94-83,83	80,48 ^b	76,78-84,17	84,94 ^b	79,76-90,11				
albumini (g/L)	35,72	34,19-37,25	30-36	33,00 ^c	30,81-35,19	35,92 ^c	34,10-37,74	35,37 ^d	33,51-37,24	33,54 ^d	31,37-35,72				
ureja (mmol/L)	5,85	5,61-6,09	4,10-5,80	6,26	5,46-7,07	5,67	5,24-6,09	5,64	5,16-6,13	6,29	5,50-7,07				
kreatinin (μmol/L)	78,34	68,31-88,37	130	69,22 ^e	56,40-82,04	77,36 ^e	65,90-88,81	72,05	60,44-83,66	74,52	61,78-87,26				
glukoza (mmol/L)	3,55	3,44-3,65	2,50-4,20	3,49	3,24-3,74	3,58	3,43-3,72	3,50	3,34-3,66	3,56	3,32-3,80				

Tabela 2. Koncentracija bilirubina, kolesterol-a, ALT, AST i GGT u krvu krava od 55. dana laktacije prikazana kao srednja vrijednost i 95% interval pouzdanosti (Engl. *Confidence limits*, CL); referentne vrijednosti ispitivanih pokazatelja sukladno Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Sveučilišta u Zagrebu te vrijednosti ispitivanih pokazatelja ovisno o tjelesnoj kondiciji i paritetu, prikazane kao srednja vrijednost i 95% CL (vrnjetost označene istim slovima označene istim slovima se statistički značajno razlikuju: ^a P=0,0199; ^b P=0,004; ili pokazuju tendenciju da budu statistički značajno različite ^c P=0,0892)

Pokazatelj	Srednja vrijednost	95% CL	Ref. vrijednost Laboratorija	BCS ≤ 2,5			BCS > 2,5			primipare			multipare		
				LSM	95% CL	LSM	95% CL	LSM	95% CL	LSM	95% CL	LSM	95% CL	LSM	95% CL
bilirubin (μmol/L)	3,87	2,68-5,06	8,60	3,95 ^a	2,68-5,23	3,53 ^a	2,29-4,76	3,88	2,60-5,09	3,64	2,37-4,90				
kolesterol (mmol/L)	5,21	5,03-5,39	2,30-4,70	4,48	3,69-5,28	4,65	4,16-5,13	5,17 ^b	4,64-5,70	3,96 ^b	3,18-4,74				
ALT (U/L)	44,39	42,03-46,75	25	39,72 ^c	33,84-45,62	44,17 ^c	40,34-47,97	42,79	38,68-46,90	41,08	35,32-46,86				
AST (U/L)	124,79	116,33-133,23	123	113,48	88,91-138,05	122,76	109,11-136,41	120,88	105,55-136,22	115,36	91,38-139,33				
GGT (U/L)	36,79	34,55-39,02	38	31,76	20,01-43,52	34,5	28,17-40,83	31,83	24,65-39,01	34,43	22,97-45,90				

i GGT, ima trend pratiti faze laktacije (Cozzi i sur., 2011.). Prema Stojeviću i sur. (2005.), vrijednost AST je viša u razdoblju od 45 dana postpartalno pa do kraja laktacije, nego odmah postpartalno ili u suhostaju, što je u skladu s našim rezultatima.

Primjena metaboličkog profiliranja, a u sklopu toga i promatranje određenih biokemijskih pokazatelja, za svako određeno razdoblje u proizvodnom, odnosno reproduktivnom životu krave, ima puno više smisla nego tradicionalno metaboličko profiliranje samo na nivou stada (Van Saum, 2000.). Metabolički profil može biti dobar dijagnostički alat ako se kombinira s kliničkim pregledom, ocjenom tjelesne kondicije i proizvodnosti životinje, kao i uvjeta u kojima živi. S obzirom da je u našem istraživanju riječ o kravama koje su kliničkim pregledom svrstane u skupinu zdravih i reproduktivno sposobnih životinja čije analize odabranih krvnih pokazatelja ne ukazuju na znatna odstupanja od fiziološkog raspona, može se pretpostaviti kako su pronađene razlike u koncentracijama ispitivanih pokazatelja pokazatelj utjecaja pariteta i tjelesne kondicije u razdoblju vrhunca laktacije.

Sažetak

Laboratorijske analize krvi daju uvid u zdravlje mlijecnih krava, kako individualno tako i u samom stаду. Mnogi od referentnih intervala su ustanovljeni za goveda općenito, ali bez podjele između mlijecnih i mesnih pasmina, i bez obzira na proizvodnu fazu. Poznato je da na proizvodnju mlijeka utječu čimbenici poput pariteta, stadija laktacije te godišnjeg doba. Za očekivati je da ti faktori utječu na krvne pokazatelje u klinički zdravih krava u laktaciji. Cilj ovog rada bio je ustvrditi vrijednosti određenih biokemijskih pokazatelja u krvi, kao dijela metaboličkog profila mlijecnih krava na jednoj farmi, i usporediti ih s referentnim vrijednostima Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti

Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također, željeli smo ispitati utjecaj pariteta i tjelesne kondicije na promatrane pokazatelje. U istraživanju je sudjelovalo 30 krava Holštajn-frizijske pasmine, u dobi od 2 do 5 godina, u vrhuncu laktacije, od 55. dana laktacije s prosječnom mlijekošću od 7797,89 kg mlijeka u 305 dana laktacije. Krave su bile podijeljene u dvije skupine ovisno o tjelesnoj kondiciji (iznad ili ispod 2,5) te ovisno o paritetu (primipare ili multipare). Ispitivani biokemijski pokazatelji krvi su određivani standardnim komercijalnim paketima reagensa, a statistička obrada podataka učinjena je programskim paketom SAS 9.3. Rezultati su pokazali kako su koncentracije ukupnih bjelančevina, ureje, kolesterola, ALT i AST nešto povišene u odnosu na referentne vrijednosti te da su vrijednosti albumina vrlo blizu gornjoj referentnoj vrijednosti za krave. Starije, multipare krave imale su povišene koncentracije ukupnih bjelančevina ($P=0,0656$) u odnosu na primipare, a primipare povišenu koncentraciju albumina ($P=0,0170$) i kolesterola ($P=0,004$) u odnosu na multipare. Krave sa slabijom tjelesnom kondicijom ($\leq 2,5$) imale su povišene vrijednosti ukupnih bjelančevina ($P=0,0492$) u odnosu na krave s boljim BCS, dok su krave s tjelesnom kondicijom iznad 2,5 imale povišene vrijednosti albumina ($P=0,005$), kreatinina ($P=0,0196$) i snižene vrijednosti bilirubina ($P=0,0199$) u odnosu na krave sa slabijim BCS. S obzirom da je riječ o kravama koje su kliničkim pregledom svrstane u skupinu zdravih životinja, čije analize odabranih biokemijskih pokazatelja krvi ne ukazuju na znatna odstupanja od fiziološkog raspona, može se pretpostaviti kako su pronađene razlike u koncentracijama ispitivanih pokazatelja pokazatelj utjecaja pariteta i tjelesne kondicije u razdoblju vrhunca laktacije.

Ključne riječi: mlijecne krave, metabolički profil, biokemijski pokazatelji, ukupni proteini, albumini, ureja, bilirubin, kolesterol, jetreni enzimi

Literatura

1. ADRIEN, M. L., D. A. MATTIAUDA, V. ARTEGOITIA, M. CARRIQUIY, G. MOTTA, O.

- BENTANCUR and A. MEIKLE (2012): Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 6, 292-299.
2. ALLISON, R. W. (2012): Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: THRALL, M. A., G. WEISER, T. W. CAMPBELL: Veterinary hematology and clinical chemistry 2nd ed. Wiley-Blackwell (460-475).
3. BLUM, J. W., P. KUNZ, H. LEUENBERGER, K. GAUTSCHI and M. KELLER (1983): Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in dairy cows. *Anim. Prod.* 36, 93-104.
4. CARLSSON, J. and B. PEHRSON (1994): The influence of the dietary balance between energy and protein on milk urea concentration. Experimental trials assessed by two different protein evaluation systems. *Acta Vet. Scand.* 35, 193-205.
5. CARVALHO, P. D., A. H. SOUZA, M. C. ADMUNDSON, K. S. HACKBART, M. J. FUENZALIDA, M. M. HERLIHY, H. AYRES, A. R. DRESCH, L. M. VIEIRA, J. N. GUENHER, R. R. GRUMMER and P. M. FRICKE (2014): Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 3666-3683.
6. CERRA, C. K., F. B. GERRY, D. M. GETZY and M. J. FETTMAN (1997): Hepatic lipidosis in anorectic, lactating holstein cattle: retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J. Vet. Int. Med.* 4, 231-237.
7. COZZI, G., L. RAVAROTTO, F. GOTTARDO, A. L. STEFANI, B. CONTIERO, L. MORO, M. BRSCIC and P. DALVIT (2011): Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J. Dairy Sci.* 94, 3895-3901.
8. EDMONSON, A. J., I. J. LEAN, L. D. WEAVER, T. FARVER and G. WEBSTER (1989): A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68-78.
9. FORENBACHER, S. (1993): Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja. Svezak II Jetra. Školska knjiga, Zagreb. (101-112).
10. HERDT, T. H. (2000): Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 387-403.
11. HOFF, B. and T. DUFFIELD (2015): Nutritional and metabolic profile testing of dairy cows. AHL LabNote 4, 1-3. <http://www.guelphlabservices.com/files/AHL/AHL%20LabNotes/LabNote04.pdf> (10. prosinac 2015.)
12. JEŽEK, J., J. STARÍČ, M. NEMEC and M. KLINKON (2013): Deviation of biochemical variables in dairy cows with reproductive disorders - data analysis. *Agric. Conspec. Sci.* 78, 267-269.
13. LAGER, K. and E. JORDAN (2012): The metabolic profile for the modern transition dairy cow. Mid-South Ruminant Nutrition Conference. Texas Agrilife Extension Service, Texas. (8-16).
14. KANEKO, J. J., J. W. HARVEY and M. L. BRUSS (1997): Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed. San Diego, Academic Press Inc.
15. OTTO, F., F. VILELA, M. HARUN, G. TAYLOR, P. BAGGASSE and E. BOGIN (2000): Biochemical blood profile of Angoni cattle in Mozambique. *Isr. J. Vet. Med.* 55, 95-102.
16. RAPHAEL, B. C., P. S. DIMICK and D. L. PUPPIONE (1973): Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J. Dairy Sci.* 56, 1025-1032.
17. ROSSATO, W., F. H. D. GONZALES, M. M. DIAS, D. RICCO, S. F. VALLE, V. L. La ROSA, T. CONCEICAO, F. DUARTE and V. WALD (2001): Number of lactations affects metabolic profile of dairy cows. *Arch. Vet. Sci.* 6, 83-88.
18. RUSSELL, K. E. and A. J. ROUSSEL (2007): Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 23, 403-426.
19. STOJEVIĆ, Z., J. PIRŠLJIN, S. MILINKOVIĆ-TUR, M. ZDELAR-TUK and B. BEER LJUBIĆ (2005): Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Vet. arhiv* 75, 67-73.
20. VAN SAUN, R. J. (2000): Blood profiles as indicators of nutritional status. *Adv. Dairy T.* 12, 402-410.
21. WATHES, D. C., Z. CHENG, N. BOURNE, V. J. TAYLOR, M. P. COFFEY and S. BROTHERTSTONE (2007): Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 203-225.

The Influence of Parity and Body Condition Score on Biochemical Parameters in Dairy Cow Serum

Branimira ŠPOLJARIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Silvije VINCE, DVM, PhD, Assistant Professor, Juraj GRIZELJ, DVM, PhD, Associate Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Tomislav DOBRANIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Darko GEREŠ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Goran ŠTIBRIĆ, DVM, „Zdenačka farma d.o.o.“, Veliki Zdenci, Croatia; Zlata FLEGAR MEŠTRIĆ, BSc, PhD, Associate Professor, Scientific Advisor, Clinical Hospital Merkur, Zagreb, Croatia

Laboratory blood analysis is good indicator of the health status of dairy cows, at both the individual and herd levels. The physiological range of most biochemical parameters has been identified for cattle in general, without differences for dairy or beef cattle breeds, or for production level. It is known that parity, lactation phase and season all influence milk yield. Therefore, they could also exert an influence on blood parameters in clinically healthy lactating dairy cows. The aim of this study was to determine the values of biochemical parameters as part of the metabolic profile of dairy cows at a Croatian farm, and to compare these to the standard, physiological values according to the Laboratory of the Internal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Also, the influence of parity and body condition on those parameters was examined. The experiment involved 30 cows, two to five years old, all in peak lactation, with an average milk yield of 7797.89 kg milk in the 305-day lactation period. Animals were divided into two groups, according to parity (primiparous and multiparous) and body condition score (\leq or $>$ 2.5). The chosen biochemical parameters were analysed with standard tools, and statistical analysis was performed using the statistical software package SAS 9.3. The

obtained results showed that concentrations of total proteins, urea, cholesterol, ALT and AST were somewhat higher than reference values, and albumin concentrations were near the upper physiological range for cows. Older, multiparous cows had a higher concentration of total proteins ($P=0.0656$) compared to primiparous cows, while primiparous cows had significantly higher concentrations of albumin ($P=0.0170$) and cholesterol ($P=0.004$) than multiparous cows. Cows with $BCS \leq 2.5$ had significantly higher concentration of total protein ($P=0.0492$) compared to cows with $BCS > 2.5$, while those had significantly higher concentrations of albumin ($P=0.005$) and creatinine ($P=0.0196$), and lower concentration of bilirubin ($P=0.0199$) when compared to cows with $BCS \leq 2.5$. Since the cows included in experiment were all considered clinically healthy, and their blood analysis did not show significant variations from the normal physiological range, we can presume that the differences in biochemical parameters obtained here are indicators of the influence of parity and body condition in the peak lactation period in cows.

Key words: *Dairy cow, Metabolic profile, Biochemical parameters, Total protein, Albumins, Urea, Bilirubin, Cholesterol, Liver enzymes*

Utvrđivanje osobitosti matica sive pčele (*Apis mellifera carnica*) značajnih za njihov uzgoj

Ivana Tlak Gajger* i Maja Komar



Uvod

Pčelarstvo je u Republici Hrvatskoj tradicionalna poljoprivredna grana velikog gospodarskog značenja. Međutim, u posljednje je vrijeme evidentan povećan gubitak zajednica medonosne pčele kao i smanjenje brojnosti populacija drugih oprasivača kukaca u prirodi, na globalnoj razini. Navedeni znatno smanjeni ukupan broj kukaca oprasivača kao i broj vrsta na nekom području ne predstavlja samo problem agro-ekološkog sustava već je zabrinjavajući problem svih kopnenih biocenoza. Naime, oprasivanje kukcima predstavlja životnu osnovu svakog kopnenog staništa. Za kvalitetnu proizvodnju u intenzivnoj poljoprivredi, kao i za povećanje populacije kukaca oprasivača u prirodi, smatra se da je umjetni uzgoj matica medonosne pčele od velike važnosti u suvremenom pčelarstvu.

Na kvalitetu matica utječu mnogi čimbenici: genotip, prehrana, metode uzgoja matica, uzgajivačka sezona, dob presađenih pčelinjih ličinki, broj uspješno prenijetih presađenih pčelinjih ličinki u uzgajivačku zajednicu te njezin zdravstveni status. Isto tako, utjecaj niza različitih nepovoljnih okolišnih

čimbenika može utjecati na kvalitetu matica, posebice klimatski uvjeti tijekom uzgajivačke sezone (Mahbobi i sur., 2012.). Budući da pčelari kvalitetu matica ne mogu procijeniti samo prema vanjskom izgledu, u obzir se moraju uzeti odlike cijele zajednice i njihova legla. Osnovna standardna morfološka mjerena u svrhu određivanja kvalitete matica jesu težina tijela matice, širina prsišta, širina glave i dužina krila (Dedej i sur., 1998., Hatch i sur., 1999., Gilley i sur., 2003., Dodoluglu i sur., 2004., Kahya i sur., 2008.). Mogući pokazatelj plodnosti je i koncentracija glikolipoproteina vitelogenina, budući da je prekursor žutanjka pri proizvodnji jaja (Tanaka i Hartfelder, 2004.).

Važno mjerilo kvalitete pčelinjih matica je i stupanj invadiranosti nametnicima. Značajnim nametničkim bolestima matica smatraju se varooza, akaroza, nozemoza tipa A i nozemoza tipa C. Matice mogu biti inficirane s jednim ili više vrsta različitih uzročnika virusnih bolesti, a to je važno s obzirom na mogućnost vertikalnog prijenosa uzročnika većine virusnih bolesti s maticom na potomstvo. Kvaliteta pojedine maticice nije samo u funkciranju

Dr. sc. Ivana TLAK GAJGER*, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Maja KOMAR, dr. med. vet., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

njezina reproduktivnog sustava ili njegov potencijal, nego i koliko dobro se sparila i koliko kvalitetnim sjemenom trutova je osjemenjena. Za određivanje zadnje navedenog pokazatelja kvalitete matica često se utvrđuje broj spermija pohranjen u spermateci pojedine matice. Osjemenjene matice obično tijekom tzv. "svadbenog leta" imaju pohranjeno od pet do sedam milijuna spermija u spermateci, a isti oplođuju jaja tijekom cijelog života matice (Rhodes i sur., 2004., Tlak Gajger, 2015.).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrđivanje morfoloških i proizvodnih osobitosti te kvalitete potencijala za razmnožavanje u većem broju pčelinjih zajednica, odnosno umjetno uzgojenih pčelinjih matice.

Materijali i metode

Uzorkovanje i prijevoz matice

Jednogodišnje matice su odmah po vađenju iz oplodnjaka stavljane u transportne kaveze u kojima su prethodno postavljeni komadići šećerne pogače i nekoliko mlađih pčela pratiteljica. Starije matice su uzorkovane tijekom pregleda iz proizvodnih pčelinjih zajednica, odnosno zbog njihove zamjene s novim maticama. U Laboratorij Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela matice smo dopremili u kartonskim kutijama. Po dopremanju kaveze s maticama smo izvadili i pohranili na sobnoj temperaturi. Sekciju, kao i sve pripremne radnje počeli smo dan nakon dostave matice. Svih 58 matice je secirano i pojedini organi obrađeni ili fiksirani za daljnju pohranu tijekom pet uzastopnih dana.

Omamljivanje matice

Bez prethodnog vađenja pčela kavez s maticom i pčelama pratiteljicama smo stavili u prozirnu PVC vrećicu i omamili ih ugljičnim dioksidom. Pri tome smo postupno u vrećicu upuštali ugljični dioksid iz plinske boce tako dugo dok

pčele nisu micale pojedinim dijelovima tijela. Tako omamljene matice pojedino smemo vadili da bismo ih uporabom digitalne gramske vase izvagali, izmjerili širinu prsišta i glave te dužinu krila.

Sekcija matice

Da bismo mogli izmjeriti širinu prsišta pojedine matice najprije smo entomološkim škaricama istoj odrezali noge, a da bi izmjerili dužinu krila prethodno smo ih pincetom odstranili od tijela matice. Matice smo secirali tako da smo na dno Petrijeve zdjelice kao podlogu stavili gumiranu masu u koju smo mogli zabadati entomološke igle prilikom fiksacije matice. Sekciju smo radili uporabom steromikroskopa (OLYMPUS SZ) pri povećanju osam puta. Svako pojedinoj omamljenoj matici smo odstranili noge, krila i glavu te je položili na pripremljenu podlogu. Prvo smo maticu fiksirali na podlogu probadajući joj prsište dvjema entomološkim iglama. Nakon toga smo medijalno na leđima učilinili rez pomoću entomoloških škarica polazeći od zadnjeg kolutića zatka prema njegovu proksimalnom dijelu. Okomito na ovaj rez učinili smo drugi i treći rez, lijevo i desno, u visini prvog kolutića



Slika 1. Organi pčelinje matice vidljivi po otvaranju šupljine zatka.

zatka. Nakon što smo oprezno otvorili šupljinu zatka pažljivo smo preparirali jajnike, spermateku i srednje crijevo matice (Slika 1.). Jajnike i spermateke smo izvagali, a zatim fiksirali u 10% formalinu, odnosno u HAYES-ovoj otopini (sastav: 0,9 g NaCl; 0,02 g KCl; 0,02 g CaCl; 0,01 g NaHC₃, 100 mL destilirane vode) u Eppendorf epruvetama.

Određivanje broja spermija

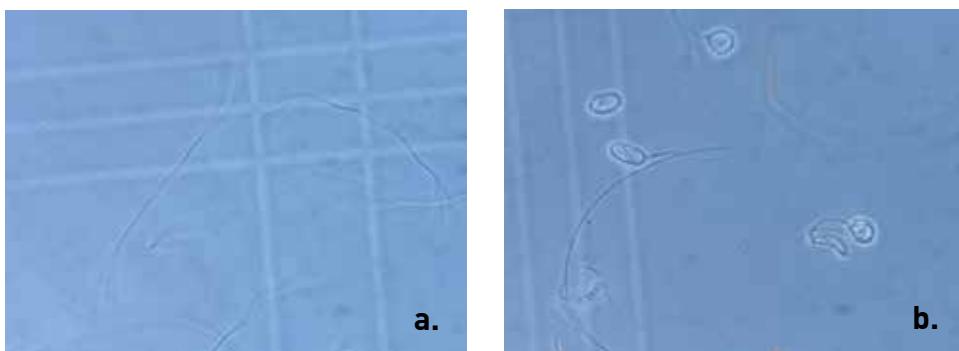
Za određivanje broja spermija primili smo suspenziju sjemene tekućine za što nam je bilo potrebno fiksirno sredstvo, destilirana voda i HAYES-ova otopina te sadržaj pojedine spermateke. Fiksirane spermateke pohranili smo u hladnjaku na 4 °C tijekom 48 sati. Spermateke smo nakon toga svaku pojedinačno prenosili pincetom u suhu jednokratnu Petrijevu zdjelicu i pažljivo odvojili traheju. Nakon bušenja stjenke spermateke s nekoliko kapi prethodno pripremljene 50 µL Hayes-ove otopine raspršili smo sjemenu tekućinu pomoću automatske pipete. Sadržaj smo prebacili u novu jednokratnu epruveticu, a Petrijevu zdjelicu isprali ostatkom otopine i sve zajedno pomiješali. Pričekali smo četiri do pet minuta i dodali 950 µL destilirane vode, što je prouzročilo uginjanje živih spermija i njihovo savijanje (Slika 2.). Nakon deset minuta dodali smo 4000 µL fiksirnog sredstva, sve za-

jedno promiješali i zatvorenu epruvetu pohranili pri temperaturi 4 °C. Ukupna količina pojedinačnog uzorka iznosila je 5000 µL. Tako pohranjene uzorke može se čuvati do tri mjeseca.

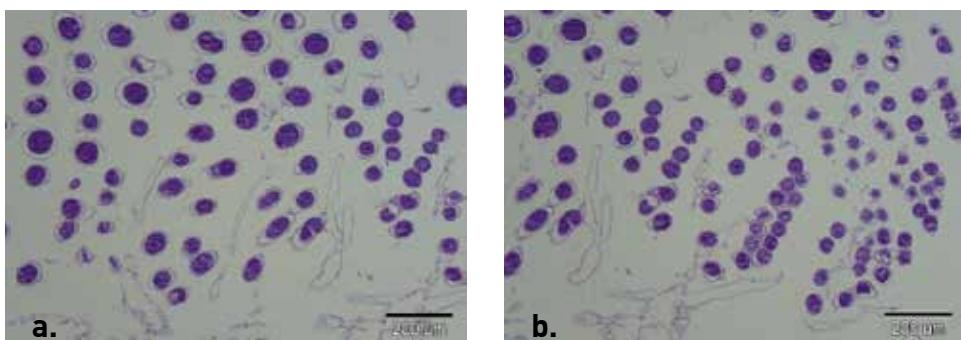
Za brojenje spermija koristili smo Bürker-Türkov hemocitometar. Epruvetu sa suspenzijom sjemene tekućine smo nekoliko puta protresli laganim pokretima da bismo promiješali spermije, zatim smo pipetom uz rub pokrovog stakalca nanijeli jednu kapljicu suspenzije, pričekali oko tri minute da se spermiji umire na dnu mrežice hemocitometra te ih izbrojili pomoću mikroskopa (OLYMPUS CX21), pod povećanjem 400 puta.

Određivanje broja jajnih cjevčica

Tijekom sekcije matica izvadili smo jajnike te ih nakon vaganja fiksirali u 10% formalinu tijekom 24 sata. Potom smo jajnike dehidrirali u serijski razrijedenom alkoholu (50%, 70%, 90%, 100%) te naposljetku u ksilenu. Tako pripremljene jajnike smo uklopili u blokove parafinskog voska (Gregorc i Bowen, 1999.). Parafinske blokove smo do daljnje obrade pohranili u kartonskim kutijama na sobnoj temperaturi. Poprečne rezove jajnika debljine 7 µm izradili smo pomoću mikrotoma proizvođača Leica. Pojedinačne rezove namjestili smo na čista predmetna stakalca te ih rehidrirali



Slika 2. Izgled spermija uginulih prije fiksacije (a.) te živih spermija (savijen rep) (b.), pod povećanjem mikroskopa 400 puta.



Slika 3 a, b. Poprečni presjek jajnika matic.

uporabom serijski razrijedenog alkohola destiliranom vodom. Konačno, preparati su obojani hematoksilin eozinom. Pripremljene histološke preparate jednog jajnika (Rhodes i Somerville, 2003.) pregledali smo i izbrojili jajne cjevčice pomoću mikroskopa pod povećanjem 200 puta te fotografirali uporabom pripadajuće digitalne mikroskopske kamere (OLYMPUS BX41), (Slika 3.). Na

svakom histološkom preparatu izabrali smo po tri presjeka pojedinog jajnika, izbrojali jajne cjevčice te odredili srednju vrijednost.

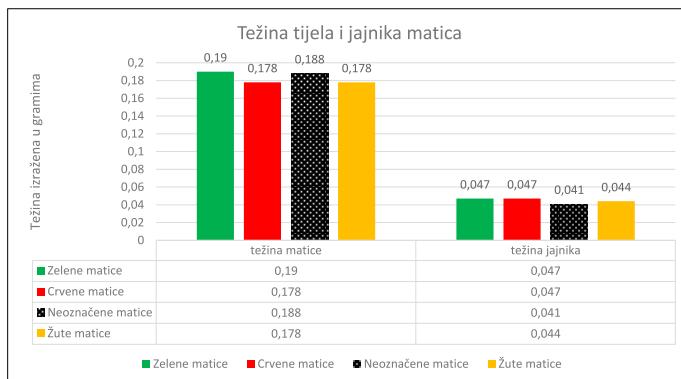
Rezultati

Rezultati su prikazani u Tabeli 1. te Slikama 4.-7.

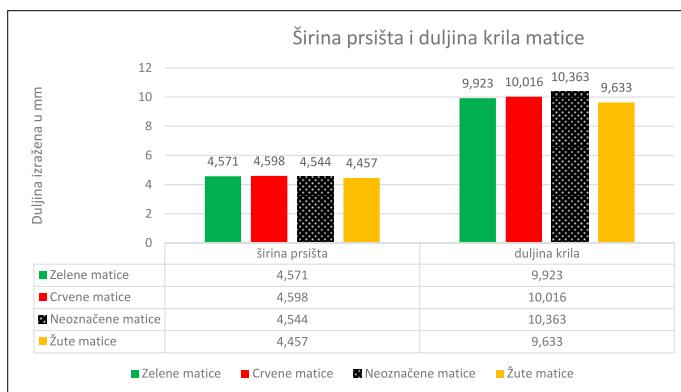
Tabela 1. Prikaz težine tijela i jajnika, širine prsišta i duljine krila matica.

Matice	Vrijednost	Težina maticе (g)	Težina jajnika (g)	Širina prsišta (mm)	Duljina krila (mm)
Zelene (Z) (n=13)	min	0,170	0,040	3,91	9,22
	max	0,233	0,077	4,86	10,75
	srednja	0,190	0,048	4,57	9,92
Neoznačene* (N*) (n=9)	min	0,157	0,007	4,19	9,83
	max	0,228	0,074	4,85	11,20
	srednja	0,198	0,040	4,54	10,65
Neoznačene (N) (n=12)	min	0,129	0,040	3,59	8,67
	max	0,215	0,063	5,09	10,85
	srednja	0,180	0,042	4,53	10,11
Crvene (C) (n=20)	min	0,148	0,025	4,22	8,99
	max	0,192	0,062	4,98	10,91
	srednja	0,178	0,042	4,59	10,01
Žute (Ž) (n=4)	min	0,182	0,035	4,30	9,22
	max	0,190	0,050	4,58	10,55
	srednja	0,178	0,044	4,45	9,66

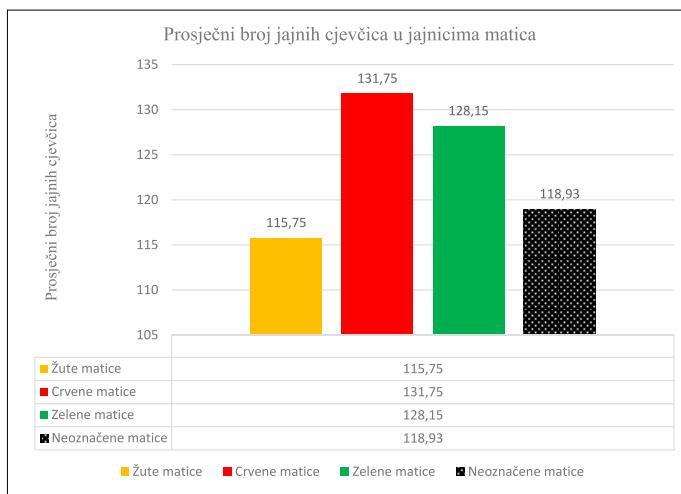
Ž = žuto označena matica iz 2012. godine; C = crveno označena matica iz 2013. godine; Z = zeleno označena matica iz 2014. godine; N = neoznačena matica; * = Umjetno uzgojene i neposredno prije uzorkovanja prirodno sparene matice iz 2014. godine.



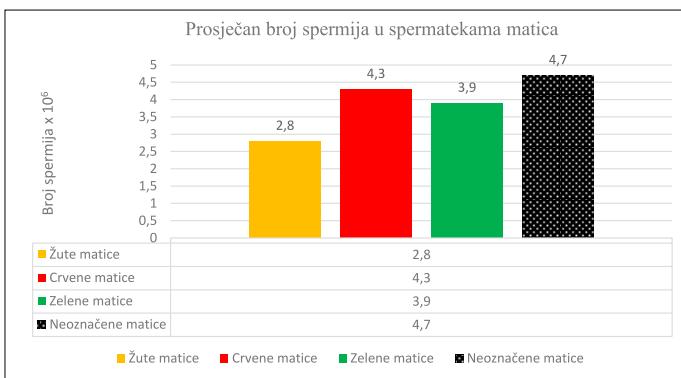
Slika 4. Prikaz posjećne težine tijela i jajnika matica.



Slika 5. Prikaz prosječne širine prsišta i duljine krila matica.



Slika 6. Prikaz prosječnog broja jajnih cjevčića utvrđenog u jajnicima matica.



Slika 7. Prikaz prosječnog broja spermija utvrđenog u spermatekama matica.

Rasprava

Postoji mnogo morfoloških pokazatelja za procjenu kvalitete pčelinje matice, ali najučestaliji su mjerjenje težine tijela, širine prsišta, širine glave i dužine krila matice (Dedej i sur., 1998., Hatch i sur., 1999., Gilley i sur., 2003., Dodoluglu i sur., 2004., Kahya i sur., 2008.). Isto tako, važno je poznавanje ostalih, za funkciranje pčelinje zajednice, nužnih pokazatelja, poput genetski i ponašajno uvjetovanih čimbenika. Na primjer: genetički uvjetovana mogućnost očitovanja visoke razine higijenskog ponašanja i mirnoće pčelinje zajednice, niska podložnost čestom rojenju te dobra proizvodnost meda (Gregorc i Lokar, 2010.). U ovom istraživanju najveća težina tijela je utvrđena za neoznačenu maticu uzorkovanu neposredno nakon umjetnog uzgoja i parenja s trutovima. Težina tijela matice iznosila je 0,240 g. Matice s najmanjom težinom su jedna neoznačena i jedna crveno označena matica, s težinom tijela 0,129 g. Sukladno posljednje navedenom, matica s najmanjom težinom tijela imala je i najmanju širinu prsišta (3,59 mm). Najveću širinu prsišta 5,09 mm imala je neoznačena matica umjetno uzgojena 2014. godine početkom aktivne pčelarske sezone. Najveća dužina krila matice iznosila je 11,20 mm, a najmanja kod matice uzgojene 2012. godine svega 8,67 mm. Najveća utvrđena težina jajnika matice iznosila je 0,077 g, a jajnici iste težine su izdvojeni tijekom sekcijske

zeleno označene matice. Najmanju masu jajnika (0,007 g) imala je neoznačena matica za koju smo tijekom sekcijske ustvrdili da je neoplođena. Inače, obje matice su umjetno uzgojene 2014. godine.

Sposobnost razmnožavanja pčelinje matice je izravno povezana sa stupnjem razvoja njezinih spolnih žlijezda. Posebice jajnici koji imaju neposrednu ulogu i funkciju pri stvaranju, razvoju i zrenju jaja. Broj razvijenih jajnih cjevčica u pojedinom jajniku proizvodne pčelinje matice je usko povezan s dobi ličinke u trenutku presađivanja u umjetne osnove matičnjaka u okviru umjetnog uzgoja matica (Ruttner, 1983.). Povećanjem dobi ličinka za presađivanje u uzgojenih i razvijenih matica može se ustvrditi svi manji broj jajnih cjevčica u njenim jajnicima. Kod matica uzgojenih iz ličinaka u dobi jednog dana prosječno se nalazi 154 jajne cjevčice, a onih uzgojenih iz ličinaka dobi dva dana 146 te tri dana 136 jajnih cjevčica u jednom jajniku (Ruttner, 1983.). Zbog navedenih vrijednosti u praksi se kao okvirni standard za maticu dobre kvalitete smatra ona čiji pojedinačni jajnik sadrži 150 ili više jajnih cjevčica. U ovom istraživanju je najveći utvrđeni broj jajnih cjevčica po jajniku utvrđen kod crvenom bojom označene matice, odnosno jednogodišnje proizvodne matice. Prosječni utvrđeni broj iznosio je 237, najmanji 222 i najveći 248 jajnih cjevčica. Najmanje jajnih cjevčica po

jajniku utvrđeno je u pčelinje matice označene zelenom bojom (2014. godine), odnosno vrlo mlade matice izašle iz prirodnog maticnjaka pred kraj klimatski i pašom loše pčelarske sezone. Od umjetno uzgojenih matica uzorkovanih neposredno po prirodnom sparivanju s trutovima, a nakon početka polaganja jaja, ustvrđeno je u prosjeku 179 jajnih cjevčica u najboljem slučaju te u prosjeku 117 jajnih cjevčica u matice najslabije kvalitete. Prosječni broj jajnih cjevčica utvrđen u svih 58 seciranih pčelinjih matica iznosio je 128, a što je vrlo slična vrijednost broju utvrđenih jajnih cjevčica u matica slovenskih uzgajivača (Anonymus, 2013.).

Pored dosad navedenih morfoloških pokazatelja, kvalitetu matica opisuje i ishod sparivanja s trutovima. Uspješnost parenja, kao i posljedična sposobnost polaganja pčelinjeg legla ovisi i o količini i kvaliteti sjemena pohranjenog u spermateci (Lodesani i sur., 2004., Al-Lawati i sur., 2009.). U ovom istraživanju najveći prosječni broj spermija utvrđen je u spermateci neoznačene umjetno uzgojene matice uzorkovane neposredno nakon prirodnog parenja s trutovima ($9,6 \times 10^6$), a najmanji u crveno označene matice ($1,5 \times 10^6$). U sličnom je istraživanju Woyke (1962.) ustvrdio prosječno sličan broj spermija (5 340 000), dok su Hatjina i sur. (2014.) ustvrdili prosječno niži broj spermija (2 780 000) kod prirodno sparenih matica. Gregorc i Smodiš Škerl (2015.) tijekom trogodišnjeg istraživanja ustvrdili su 2006. godine prosječno 3 300 000, 2008. godine prosječno 4 960 000, a 2010. godine prosječno 5 230 000 spermija u pretraživanim spermatekama prirodno sparenih matica slovenskih registriranih uzgajivača.

Brojenjem spermija u spermatekama iz analiziranih mladih matica ustvrđeno je da je 9,52% matica bilo loše spreno, odnosno u spermateci su imale manje od 3 milijuna spermija, što je znatno manje u usporedbi s rezultatima istraživanja koje su proveli Camazine i sur. (1998.), gdje su na uzorku od 325 matica iz 13 različitih

komercijalnih uzgoja utvrdili 19% loše sparenih matica.

Obradom dobivenih rezultata utvrđeno je da je broj jajnih cjevčica u jajnicima bio veći kod matica koje su imale veću težinu jajnika, širinu prsišta i duljinu krila. Najveći prosječni broj spermija u spermatekama utvrđen je kod matica koje su 2014. godine bile umjetno uzgojene i uzorkovane neposredno nakon prirodnog parenja s trutovima. Utvrđivanjem morfoloških i proizvodnih osobitosti matica i trutova te kvalitete potencijala za razmnožavanje u većem broju pčelinjih zajednica, odnosno kod umjetno uzgojenih i/ili umjetno osjemenjenih pčelinjih matica, može se na osnovu dobivenih rezultata odabrati pčelinje zajednice s najpoželjnijim svojstvima za daljnji uzgoj.

Sažetak

Medonosne pčele su najvažniji i najbrojniji prirodni opašivači te predstavljaju važan dio prirodnih ekosustava. Za procjenu kvalitete pojedinih pčelinjih matica postoji mnogo pokazatelja, a neki od njih su: proizvodnost, mirnoća, agresivnost i higijensko ponašanje pčelinje zajednice. Isto su tako važne morfološke karakteristike matica kao što su težina tijela, širina prsišta i glave te duljina krila. Uobičajeno je i određivanje težine jajnika, broja jajnih cjevčica u jajniku te broja spermija u spermatekama matica. Cilj je ovog istraživanja bio utvrditi morfološke osobitosti te kvalitetu potencijala za razmnožavanje umjetno uzgojenih pčelinjih matica. Obradom rezultata utvrđeno je da su najveći broj spermija u spermatekama imale umjetno uzgojene matice uzorkovane neposredno nakon parenja s trutovima te da su matice s većom težinom jajnika, širinom prsišta i duljinom krila imale veći broj jajnih cjevčica u jajnicima.

Ključne riječi: pčelinja matica, jajnici, spermiji, morfološke karakteristike

Literatura

1. AL-LAWATI, H., G. KAMP and K. BIENEFFELD (2009): Characteristics of the spermathecal contents of old and young honey bee queens. J. Insect Physiol. 55, 116-121.

2. Anon. (2013): Spremljanje kakavnosti vzrejenih kranjske čebele za programsko obdobje 2011 – 2013. Poročilo o izvedenem ukrepu. Kmetijski Institut Slovenije.
3. CAMAZINE, S., I. CAKMAN, K. CRAMP, J. FINLEY, J. FISHER, M. FRAZIER and A. ROZO (1998): How healthy are commercially produced US honey bee queens? *Am Bee J.* 138, 677-680.
4. DEDEJ, S., K. HARTFELDER, P. AUMEIER, P. ROSENKRANS and W. ENGELS (1998): Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apicul. Res.* 37, 193-190.
5. DODOLOGLU, A., B. EMSEN and F. GENE (2004): Comparison of some characteristics of queen honey bee (*Apis mellifera L.*) reared by using Doolittle method and natural queen cells. *J. Appl. Res.* 26, 113-115.
6. GILLEY, D. Č., D. R. TARPY and B. B. LAND (2003): The effect of queen quality on the interactions of workers and duelling queen honey bees (*Apis mellifera L.*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 55, 190-196.
7. GREGORC, A. and I. D. BOWEN (1999): *In situ* localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera L.*) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. *Cell Biol. Int.* 23, 211-221.
8. GREGORC, A. and M. SMODIŠ ŠKERL (2015): Characteristic of honeybee (*Apis mellifera carnica*, Pollman 1879) queens reared in Slovenian commercial breeding stations. *J. Apic. Sci.* 59, 5-12.
9. GREGORC, A. and V. LOKAR (2010): Selection criteria in an apriary of Carnolian honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies for queen rearing. *J. Centr. Eur. Agr.* 11, 401-408.
10. HATCH, S., D. R. TARPY and D. J. C. FLATCHESTER (1999): Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. *Insect. Soc.* 46, 372-377.
11. HATJINA, F., C. COSTA, R. BÜCHLER, A. UZUNOV, M. DRAZIC, J. FILIPI, L. CHARISTOS, L. RUOTTINEN, S. ANDONOV, M. D. MEIXNER, M. BIENKOWSKA, G. DARIUSZ, B. PANASIUK, Y. LE CONTE, J. WILDE, S. BERG, M. BOUGA, W. DYRBIA, H. KIPRIJANOVSKA, S. KORPELA, P. KRYGER, M. LODESANI, M. PECHHACKER, P. PELOVSKY, N. TROV and N. KEZIC (2014): Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *J. Apicul. Res.* 53, 233-247. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.05>
12. KAHYA, Y., H. V. GANCER and J. WOYKE (2008): Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *J. Apicul. Res.* 47, 118-125.
13. LODESANI, M., D. BALDUZZI and A. GALLI (2004): A study of spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. *J. Apicul. Res.* 43, 27-28.
14. MAHBOBI, A., M. FARSHINEH-ADI, J. WOYKE, S. and S. ABBASI (2012): Effects of the age of grafted larvae and the effects of supplemental feeding on some morphological characteristics of Iranian queen honey bees (*Apis mellifera meda*, Skorikov 1929). *J. Apic. Sci.* 56, 93-98.
15. RHODES, J. W. and D. C. SOMERVILLE (2003): Introduction and early performance of queen bees - some factors affecting success. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, P. 44
16. RHODES, J. W., D. C. SOMERVILLE and S. HARDEN (2004): Queen honey bee introduction and early survival - effects of queen age at introduction. *Apidologie* 35, 383-388.
17. RUTTNER, F. (1983): Queen rearing: Biological basis and technical instruction Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania.
18. TANAKA, E. D. and K. HARTFELDER (2004): The initial stage of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bees (*Apis mellifera*) castes. *Arth. Struc. Dev.* 33, 431-442.
19. TLAK GAJGER, I. (2015): Nastavni tekst objavljen na web stranicama Veterinarskog fakulteta: Odabrana poglavlja intenzivne pčelarske proizvodnje – Uzgoj matice; Proizvodnja matične mlijeci. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska. (http://vef.unizg.hr/doc.sec/bolesti_u_suvremenoj_pcelarskoj_proizvodnji/_tlak_gajger_i_odabrana_poglavlja_intenzivne_pcelarske_proizvodnje.pdf).
20. WOYKE, J. (1962): Natural and artificial insemination on queen honeybees. *Bee World* 43, 21-25.

Determination of Significant Rearing Characteristics of the Carnolian Honeybee Queen (*Apis mellifera carnica*)

Ivana TLAK GAJGER, DVM, PhD, Associate Professor, Maja KOMAR, DVM, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

Honeybees (*Apis mellifera*) are among the most significant and numerous pollinators, and as such are an important component of natural ecosystems. There are many indicators used to assess the quality of honeybee colonies, including honey production, gentleness, aggressiveness and hygienic behaviour. The morphological characteristics of honeybee queens are also important, such as body weight, thorax width, head width and wing length. Ovary weight, the number of ovarioles in the ovaries and the number of sperm in the queen's spermatheca

may also be determined. The aim of this study was to investigate the morphological characteristics and potential reproductive quality of artificially reared queens. The analysis showed that a higher sperm count was found in the spermatheca of artificially reared queens just after natural mating with drones, and queens with the highest ovary weight, thorax width and wing lengths had the highest number of ovarioles in the ovaries.

Key words: Honeybee queen, Ovaries, Sperm, Morphological characteristics

Učinak gama zračenja na pokretljivost i preživljavanje spermija pijetlova teške pasmine

M. Bujanić, M. Vilić, Ž. Gottstein, Jadranka Pejaković Hlede,
Ivana Žura Žaja i Martina Lojkic*



Uvod

Sva su živa bića izložena prirodnim izvorima ionizirajućeg zračenja. No, nema nikakve sumnje da su velike doze ionizirajućeg zračenja štetne za živi organizam (ICRP, 1990., UNSCEAR, 2000.), odnosno da postoji linearni odnos doze zračenja i mortaliteta, odnosno kancerogeneze i pojave mutacija. Međutim, kada je riječ o malim dozama ionizirajućeg zračenja postoje mnoge kontroverze i ne može se sa sigurnošću ustvrditi odnos doze i učinka.

Biološki učinci srednjih i velikih doza posljedica su ponajprije, oštećenja molekule DNK (Hall, 1994.), a mogu se očitovati na ozračenoj jedinki (tzv. somatski učinci) ili na njenim potomcima (genetski ili nasljedni učinci) (Bacq i Alexander, 1961.). Genetski materijal u ozračenoj stanici može pretrpjeti oštećenja različitih tipova i žestine s potencijalno ozbiljnim posljedicama. S obzirom na građu DNK najznačajnija oštećenja koja se opažaju na molekuli DNK su jednostruki i/ili dvostruki lom uzvojnice DNK. Za dvostruki lom uzvojnica DNK postoje jasni dokazi

da prouzroči smrt stanice, mutaciju ili karcinogenezu (Hall, 1994.).

Učinci srednjih i velikih doza ionizirajućeg zračenja dobro su poznati. S druge strane male doze ionizirajućeg zračenja predmet su brojnih istraživanja jer predstavljaju kontroverzno područje kako u radiobiologiji tako i u zaštiti od zračenja.

Pod malom dozom ionizirajućeg zračenja podrazumijevamo doze do 0,5 Gy x, beta i gama-zračenja čija apsorbirana doza odgovara ekvivalentnoj dozi od 0,5 Sv primljene akutno pri relativno visokim brzinama doza, ili doze primljene frakcionirano, s time da je svaka od njih manja od 0,1 Gy/godišnje, bez obzira na brzinu doze (ICRP, 1990.).

Biološki učinci malih doza procjenjuju se ekstrapolacijom bioloških učinaka velikih doza. Međutim, podatci brojnih istraživanja ukazuju da male doze ionizirajućeg zračenja prouzroče fiziološke učinke koje se ne mogu predvidjeti, odnosno ekstrapolirati linearnom krivuljom iz područja velikih doza. Štoviše, takve doze zračenja mogu

Miljenko BUJANIĆ, dr. med. vet., doktorand, dr. sc. Marinko VILIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Željko GOTTSSTEIN, dr. med. vet., docent, Jadranka PEJAKOVIĆ HLEDE, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Ivona ŽURA ŽAJA, dr. med. vet., postdoktorandica, dr. sc. Martina LOJKIĆ*, (dopisni autor, e-mail: mlojkic@vef.hr), dr. med. vet., docentica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

i korisno djelovati na životne procese (Luckey, 1982.). Pored toga, istraživanja obavljena *in vitro* i *in vivo* dokazala su različite zaštitne odgovore poput aktiviranja mehanizma detoksikacije slobodnih radikala, stimuliranja različitih puteva popravaka DNK te uklanjanja potencijalno oštećenih stanica aktivacijom imunološkog sustava ili apoptozom (Köteles, 2000., Ohyama i sur., 2004.).

Učinci ionizirajućeg zračenja na kvalitetu sperme u ljudi i malih sisavaca dobro su poznati. Poznato je primjerice da ozračivanje ljudi dozom većom od 2 Gy prouzroči trajnu neplodnost (Howell i Shalet, 1998.), dok ozračivanje dozom od 0,1 Gy smanjuje broj spermija (Hall, 1994.). Ionizirajuće zračenje može oštetiti mitohondrijsku DNK spermija te prouzročiti manju pokretljivost spermija (Kao i sur., 1998.) ili pak jezgrinu DNK što može imati negativan učinak u sljedećim generacijama (Georgieva i sur., 2006.).

Dosadašnja istraživanja malih doza ionizirajućeg zračenja u peradi temelje se pretežito na proizvodne pokazatelje i to valivost pilića, tjelesnu masu, konverziju hrane (Todorov i Dijanovski, 1984., Kraljević i sur., 2000.), dok su istraživanja učinaka takvih doza na reproduksijske pokazatelje vrlo oskudna.

Polazeći dakle od činjenice da u literaturi postoje malobrojni rezultati glede učinka male doze ionizirajućeg zračenja na reproduksijske pokazatelje pijetlova cilj rada bio je istražiti učinak različitih doza gama-zračenja na pokretljivost i preživljavanje spermija nakon ozračivanja dozama od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy.

Materijali i metode

Pokusne životinje

Pokus smo radili na pijetlovima matičnog jata teške pasmine (n=5) starim 45 tjedana. Pijetlovi su držani na dubokoj stelji u pokusnoj prostoriji Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fa-

kulteta Sveučilišta u Zagrebu (zatvoreni podni sustav) uz stalno mjerjenje mikroklimatskih pokazatelja. Tijekom pokusa životinje su uzimale hranu i vodu *ad libitum*. Mjesec dana prije početka pokusa pijetlove smo uvježbavali, u razmaku od tri dana, na postupak uzimanja ejakulata. (Pokus je rađen po Rješenju Ministarstva Poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo, Klasa:UP/I-322-01/12-01/125; Urbroj:525-10/0255-12-2).

Uzimanje ejakulata pijetlova

Ejakulat pijetlova uzeli smo jednokratno, metodom lumbalne masaže (Lake i sur., 1985., Cergolj i Samardžija, 2006.). Ukratko, pijetlovima smo rukom masirali leđa dok nije nastupilo refleksno dizanje repa. Nakon toga, palcem i kažiprstom pritisnuli smo kloaku pri čemu je došlo do ejakulacije. Ejakulat smo uzimali u graduiranoj plastičnoj epruvetu. Pijetlove pri opisanoj metodi uzimanja ejakulata nismo anestezirali niti sedirali. Neposredno nakon ejakulacije, spermu smo razrijedili s razrjeđivačem (ASG medij, Wageningen University, Lelystad, Nizozemska) u omjeru 1:1 i dostavili u laboratorij. Nakon određivanja koncentracije spermija sve smo uzorke razrijedili na koncentraciju od 1200×10^6 spermij/mL.

Ozračivanje spermija

Razrjeđeni ejakulat pijetlova ozračili smo (*in vitro*) dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama-zračenja iz radioaktivnog izvora kobalt-60 (^{60}Co) panoramskog tipa u Institutu „Ruđer Bošković“, Bijenička cesta 54, Zagreb, (n=5 uzoraka sperme / dozi). Brzina doze iznosila je 0,0094 Gy/s. Volumen uzorka sperme iznosio je 1 mL.

Analiza uzoraka

U svakom uzorku sjemena odredili smo pokretljivost i postotak živih/mrtvih spermija neposredno prije ozračivanja te tri sata nakon ozračivanja. Pokretljivost spermija odredili smo pomoću fazno kontrastnog mikroskopa (40 x) na 37

°C. Subjektivno smo odredili gibanje spermija, brojeći ukupno 100 spermija i klasificirajući ih kao progresivno pokretne ili nepokretne, a rezultat prikazali kao postotak (%). Koncentraciju sperme odredili smo brojanjem u komorici po Thoma-i (Cergolj i Samardžija, 2006.). Količinu od 10 µL sperme razrijedili smo s 990 µL destilirane vode, kako bi imobilizirali spermije i olakšali brojanje. Za određivanje postotka živih i mrtvih spermija koristili smo bojanje s eozinom i nigrozinom prema Glod-u (1976.). Na predmetnicu smo stavili kap sperme i dvije kapi eozin/nigrozin bojila. Nakon miješanja načinili smo razmaz i pregledali ga, nakon sušenja, pod imerzijskim povećanjem (1000 x). Živi spermiji zbog intaktne membrane ostali su neobojani, dok su mrtvi spermiji zbog oštećene membrane propustljivi za eozin i obojani crveno (Slika 3). Brojili smo ukupno 200 spermija po razmazu, a rezultat brojenja živih i mrtvih spermija prikazali smo u postotcima (%).

Statistička obrada podataka

Dobivene rezultate prikazali smo kao srednju vrijednost (SV) i standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SE). Značajnost razlika među rezultatima pokusa provjerili smo ANOVA testom koristeći se statističkim programom Statistica Ver. 7 software (StatSoft Inc. SAD). Značajne razlike izražene su na razini vjerojatnosti $P < 0,05$.

Rezultati

Rezultati učinka ionizirajućeg zračenja na pokretljivost i postotak živih spermija u uzorcima sperme pijetlova teške pasmine nakon ozračivanja *in vitro* dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy prikazani su na slikama 1 i 2.

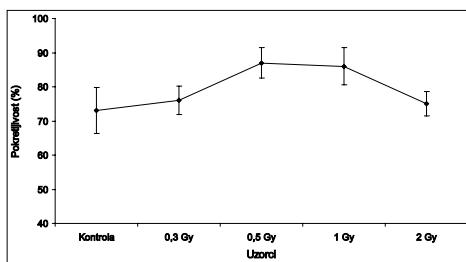
Na slici 1. vidljivo je da je pokretljivost spermija svih ozračenih uzoraka bila veća u odnosu na pokretljivost spermija kontrolnog uzorka, pri čemu je pokretljivost

spermija uzoraka ozračenih dozom od 0,5 Gy i 1 Gy bila najveća. Međutim, niti jedno povećanje pokretljivosti spermija nakon ozračivanja dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy nije bilo statistički značajno.

Na slici 2. razabire se da je postotak živih spermija u svih ozračenih uzoraka bio manji u odnosu na postotak živih spermija u uzorku kontrolne skupine. Razlika živih spermija ozračenih uzoraka i kontrole nije, međutim, bila statistički značajna.

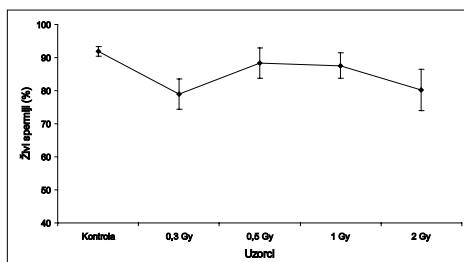
Rasprava

Cilj rada bio je istražiti učinak različitih doza gama-zračenja na pokretljivost i preživljavanje spermija pijetlova. Poznato je da su velike doze ionizirajućeg zračenja štetne za živi organizam (ICRP, 1990., UNSCEAR, 2000.). Isto tako, poznato je da zračenje negativno utječe na koncentraciju i pokretljivost spermija ljudi (Cheburkov i Cheburkova, 1993.), kunića (Georgieva i sur., 2006.) i štakora (Lock i Soares, 1980.). Prvi radovi koji su se bavili učincima malih doza ionizirajućeg zračenja na spermije peradi pokazali su da se plodnost i valivost jaja u pasmine White Rock i New Hampshire povećava nakon ozračivanja sperme *in vitro* dozom u rasponu od 0,017 do 1,8 Gy gama-zračenja (Jilo i Löhle, 1991.). Isto tako, najveća plodnost od 93,1% zabilježena je kod spermija ozračenih dozom od 1,7 do 1,8 Gy, dok je nešto manja plodnost spermija (92,3%) zabilježena nakon ozračivanja dozom od 0,85 do 0,92 Gy. Suprotno tome, navedeni su autori ustvrdili značajan pad plodnosti spermija nakon ozračivanja dozom u rasponu od 2 do 8 Gy, što je u skladu i s našim rezultatima, gdje smo dobili da se nakon ozračivanja dozom od 0,5 Gy i 1 Gy povećava pokretljivost u odnosu na kontrolni uzorak, dok se kod veće doze ionizirajućeg zračenja (2 Gy) pokretljivost znatno smanjila u odnosu na uzorke ozračene dozom od 0,5 Gy i 1



Slika 1. Pokretljivost spermija pijetlova teške pasmine nakon ozračivanja uzoraka sperme *in vitro* dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama-zračenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija, (n=5/dozi).

Gy. Veća pokretljivost smanjuje vrijeme koje je potrebno da spermij pronađe jajnu stanicu, a samim time se povećava i mogućnost oplodnje, odnosno smanjuje rizik od preranog umiranja spermija/jajne stanice. Zbog specifične građe, spermij ima malu količinu nekromosomskog materijala. Smanjenje plodnosti spermija nakon ozračivanja velikim dozama ionizirajućeg zračenja nastaje zbog učinka takvih doza na molekulu DNK. Gama zračenje prouzroči kromosomske delekcije ili kromosomske translokacije i inverzije, čime je i objašnjeno mutageno djelovanje na spermije. Naši rezultati smanjene pokretljivosti spermija kod ozračivanja visokom dozom zračenja (2 Gy) u skladu su s istraživanjem Kao i sur. (1998.) koji su dokazali da ionizirajuće zračenje



Slika 2. Postotak živih spermija pijetlova teške pasmine nakon ozračivanja uzoraka sperme *in vitro* dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama-zračenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija, (n=5/dozi).

prouzroči oštećenje mitohondrijske DNK molekule, zbog čega dolazi do smanjene pokretljivosti spermija. Sličnom problematikom, tj. učincima ionizirajućeg zračenja na kvalitetu (plodnost) spermija ozračenih *in vitro* i *in vivo* bavili su se i drugi autori kao primjerice Wishart i Dick (1985.) i Burruel i sur. (1997.) koristeći pri svojim istraživanjima gotovo uvijek velike doze različitih vrsta ionizirajućeg zračenja. Tako je dokazano da ozračivanje spermija velikim dozama ionizirajućeg zračenja (do 300 Gy) ne utječe na njihovu pokretljivost, ali da nakon oplodnje prouzroče abnormalnosti tijekom razvoja zametka (Wishart i Dick, 1985.).

Postotak živih spermija u našem istraživanju pada s povećanjem doze zračenja od 0,5 Gy, 1 Gy pa do 2 Gy što možemo tumačiti oštećenjem DNK molekule ionizirajućim zračenjem, zbog čega dolazi do propadanja spermija. Naime, Milić i sur. (2013.) pokazali su da je oštećenje DNK molekule spermija pijetlova nakon ozračivanja gama zračenjem u rasponu od 0,3 do 2 Gy proporcionalno porastu doze. S druge strane, Woon i sur. (2011.) pokazali su da male doze i male brzine ionizirajućeg zračenja ne utječu na pojavu abnormalnih oblika spermija.

I na kraju, rezultati ovog istraživanja pokazuju da ozračivanje sperme pijetlova *in vitro* dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama zračenja pri brzini od 9,4 mGy/s



Slika 3. Prikaz živih (neobojani) i mrtvih (obojani) spermija u uzorcima sperme pijetlova teške pasmine nakon ozračivanja dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama-zračenja.

ne prouzroči promjene u pokretljivosti i preživljavanju spermija. No, uzimajući u obzir da su iste doze i genotoksične (Milić i sur., 2011.) smatramo da je za cijelokupnu interpretaciju učinka gama zračenja na plodnost sperme pijetlova u rasponu doza od 0,3 Gy do 2 Gy neophodno potrebna istovremena analiza genotoksičnosti i makroskopskih pokazatelja.

Sažetak

S obzirom da u literaturi postoje malobrojni rezultati glede učinka male doze ionizirajućeg zračenja na reproduksijske pokazatelje pijetlova svrha ovog istraživanja bila je istražiti učinak različitih doza gama zračenja na pokretljivost i preživljavanje njihovih spermija. Pokus je načinjen na pijetlovima matičnog jata teške pasmine. Sperma je uzeta jednokratno, lumbalnom masažom i nakon razrjeđivanja ozračena (*in vitro*) dozom od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy gama-zračenja iz radioaktivnog izvora kobalt-60 (^{60}Co). Pokretljivost i postotak živilih/mrtvih spermija određeni su prije (kontrola) i nakon ozračivanja. Pokretljivost kod svih ozračenih uzoraka bila je veća u odnosu na kontrolu, s time da je pokretljivost bila najveća kod uzoraka ozračenih dozama od 0,5 Gy i 1 Gy, dok je kod uzorka ozračenog dozom od 2 Gy pokretljivost pala u odnosu na uzorke ozračene malom dozom. Postotak živilih spermija neznatno se smanjio u odnosu na kontrolnu skupinu kod uzoraka ozračenih dozama od 0,5 Gy i 1 Gy, dok je najveći pad preživljavanja uočen kod uzoraka ozračenih dozom od 2 Gy. Međutim, opisane razlike u pokretljivosti i postotku živilih spermija u ozračenim uzorcima nisu bile statistički značajne. Može se zaključiti da ozračivanje spermija dozama gama zračenja od 0,3 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy i 2 Gy nije utjecalo na pokretljivost i preživljavanje pijetlova teških pasmina.

Ključne riječi: gama zračenje, pokretljivost spermije, pijetlovi

Literatura

1. BACQ, E. M. and P. ALEXANDER (1961): Fundamentals of radiobiology, 2. ed. Oxford: Pergamon Press, pp. 1-5.
2. BURRUEL, V. R., O. G. RAABE and L. M. WILEY (1997): *In vitro* fertilization rate of mouse oocytes with spermatozoa from the F offspring of males irradiated with 1.0 Gy ^{137}Cs γ -rays. *Mutat. Res.* 381, 59-66.
3. CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. M. Samardžija (ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta Zagreb.
4. CHEBURKOV, Y. Y. and O. P. CHEBURKOVA (1993): Disorders of spermatogenesis in people working at the clean-up of the Chernobyl nuclear power accident. *Tadiats. Biol. Radioecol.* 33, 771-774.
5. GEORGIEVA, S., P. GEORGIEV, S. TANCHEV and E. ZHELYAZKOV (2006): Effect of external gamma irradiation on rabbit spermatogenesis. *Trakia J. Sci.* 1, 22-26.
6. GLOD, W. (1976): Reproduction and bovine insemination. Chapter V. Semen evaluation. PWRI, Warszawa (115-138).
7. HALL, E. J. (1994): Radiobiology for the Radiologist. 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia.
8. HOWELL, S. and S. SHALET (1998): Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27, 927-943.
9. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (1990): "1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection", ICRP Publication 60, Pergamon Press. Oxford, New York.
10. JILO, A. and K. LÖHLE (1991): Untersuchungen über den Einflus der gammabestrahlung Co-60 von sperma und Bruteiern verschiedener hunerrassen bzw.-genotypen auf die Brutleistungen Mh.Vet.-Med. 46, 622-625.
11. KAO, S. H., H. T. CHAO and Y. H. WEI (1998): Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline in motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Human Reprod.* 4, 657-666.
12. KÖTELES, G. J. (2000): Biological basis of radiation protection: New aspects. *Centr. Europ. J. Occup. Env. Med.* 6, 79-87.
13. KRALJEVIĆ, P., N. MAS, Z. POLAK, M. ŠIMPRAGA i S. MILJANIĆ (2000): Tjelesna masa i prirast tovnih pilica izvaljenih iz jaja ozračenih malom dozom gama zračenja prije inkubacije. Drugi hrvatski veterinarski kongres, 10.-13. listopada. Cavtat. Zbornik radova. Hrvatska veterinarska komora i Veterinarski fakultet Zagreb.
14. LAKE, P. E., O. RAVIE, D. NADDINGTON (1985): Some effects of the composition of inseminated semen and the site of its deposition and fertility in *Gallus domesticus*. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 273-284.
15. LOCK, L., F. and E. R. SOARES (1980): Increases in morphologically abnormal sperm in rats exposed to Co^{60} irradiation. *Environ. Mutagen.* 2, 125-131.
16. LUCKEY, T. D. (1982): Physiological Benefit from Low Levels of Ionizing Radiation. *Health Phys.* 43, 771-789.
17. MILIĆ, M., M. VILIĆ, V. KAŠUBA, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, Ž. GOTSTEIN, M. KARADJOLE and S. MILJANIĆ (2013): The assessment of DNA damage in poultry spermatozoa after exposure to low doses of ionising radiation. CRPA Proceedings of the

- 9th Symposium of the CROATIAN RADIATION PROTECTION ASSOCIATION (editors: Ž. Knežević, M. Majer, I. Krajcar Branić) (147-152).
18. OHYAMA, H., B. WANG and O. YUKAWA (2004): Radiation hormesis: Stimulatory effects of low doses ionizing radiation. Geriatrics and Gerontology International 4, S84-S86.
19. TODOROV, B. and P. DIJANOVSKI (1984): Enzyme activity in blood plazma of turkey and pheasant received from irradiated with Small doses gamma-rays eggs. Final program and Books of abstract of XVth annual meeting of European Society of Nuclear Methods in Agriculture. Piacenza, Italy.
20. UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON EFFECTS OF ATOMIC RADIATION (2000): Annex G. In: Sources and Effects of Ionizing Radiatio. UNSCEAR. New York. Report to the General Assembly with scientific Annexes.
21. U.S. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON THE BIOLOGICAL EFFECTS OF IONIZING RADIATION (BEIR Committee) (2006): Health effects of exposure to low levels of ionizing radiation. Washington, DC: National Academy Press: BEIR VII.
22. WISHART, G., J. and L. A. DICK (1985): Effect of gamma-radiation on fowl sperm function *in vitro* and *in vivo*. J. Reprod. Fertil. 75, 617-622.
23. WOON, J. H., S. C. SHIN, Y. M. KANG and H. S. KIM (2011): Sperm abnormalities in high- and low-dose-rate Γ -irradiated Korean dark-striped field mice, *Apodemus agrarius coreae*. Radiat. Prot. Dosimetry 146, 280-282.

Motility and Viability of Cock Spermatozoa Following Exposure to Gamma Irradiation

Miljenko BUJANIĆ, DVM, Doctoral Student, Marinko VILIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Željko GOTTSSTEIN, DVM, PhD, Assistant Professor, Jadranka PEJAKOVIĆ HLEDE, DVM, Assistant, Ivona ŽURA ŽAJA, DVM, Postdoctoral Student, Martina LOJKIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

There are very few data in the literature regarding the effect of low dose gamma irradiation on the reproductive parameters in cocks. The aim of this study was to investigate the effect of a range of gamma irradiation doses on sperm motility and viability. The experiment was conducted on cocks of heavy breeds. Semen was collected once by lumbar massage, diluted and exposed (*in vitro*) to 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy and 2 Gy of gamma rays from radioactive cobalt (^{60}Co). Motility and viability of sperm was assessed prior to (control) and following exposure to gamma rays. Motility in all irradiated samples was higher in comparison to control values and was highest in samples exposed to doses from 0.5 and 1 Gy. However, motility in

samples exposed to doses of 2 Gy was lower than in samples exposed to lower doses. The percentage of viable spermatozoa was slightly decreased in comparison to the control group in samples exposed to doses of 0.5 Gy and 1 Gy, whereas the lowest viability rate was observed in samples exposed to a dose of 2 Gy. However, the differences in motility and viability of spermatozoa samples exposed to gamma irradiation were not statistically significant. It could be concluded that exposure to 0.3 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy and 2 Gy of gamma irradiation does not affect the motility or viability of heavy breed cock spermatozoa.

Key words: *Gamma irradiation, Sperm motility, Cocks*

Termotolerantni *Campylobacter* spp. – uzročnici kampilobakterioze (II. dio)

Marina Mikulić*, Andrea Humski, B. Njari, M. Ostović i Ž. Cvetnić



Uvod

Tijekom 70-ih godina prošlog stoljeća termotolerantna bakterija *Campylobacter* (C.) *jejuni* po prvi puta je prepoznata kao uzročnik kampilobakterioze u ljudi (Altekruše i sur., 1999.). Glavni izvor obolijevanja ljudi je potrošnja nedovoljno toplinski obrađenog mesa peradi, prije svega mesa tovnih pilića. Prema podatcima službenih laboratorija za kontrolu hrane, u Republici Hrvatskoj je 2012. godine ustanovljena prisutnost *Campylobacter* spp. u 5% uzoraka hrane (MP i HAH, 2013.). Kampilobakterioza se primarno smatra želučano-crijevnim oboljenjem, a u rijetkim slučajevima bakterije uzrokuju septikemiju i/ili ostale komplikacije bolesti. Prijava bolesti u ljudi obvezna je u našoj zemlji od 2007. godine, a broj potvrđenih slučajeva kampilobakterioze iz godine u godinu raste. Ukupno su u Republici Hrvatskoj 2015. godine prijavljena 1.371 slučaja oboljelih, što ovu zoonozu, nakon salmoneloze, svrstava na drugo mjesto po učestalosti (OIE WAHIS, 2016.).

Prisutnost kampilobaktera u pilećem mesu, ostalim vrstama hrane i vodi za piće

Pileće meso predstavlja jeftin i lako dostupan izvor visokokvalitetnih bjelančevina, bogat esencijalnim aminokiselinama, vitaminima i mineralima. Potrošnja pilećeg mesa, kao i njegovih proizvoda, često se povezuje sa slučajevima akutne kampilobakterioze, naročito u djece te starijih i imunosupresivnih osoba. Dioksinska kriza 1999. godine u Belgiji imala je za posljedicu povlačenje svježeg pilećeg mesa s tržišta, nakon čega je uslijedio pad broja slučajeva ljudi oboljelih od kampilobakterioze, čime je po prvi puta pileće meso prepoznato kao glavni izvor ove bolesti u ljudi (Vellinga i Van Loock, 2002.). Isto tako, prilikom ponovnog puštanja svježeg pilećeg mesa u prodaju na tržištu Islanda 1996. godine, gdje se do tada plasiralo jedino smrznuto meso peradi, zabilježena je znatno veća

Dr. sc. Marina MIKULIĆ*, dr. med. vet., poslijedoktorandica, (dopisni autor, e-mail: mikulic@veinst.hr), dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, naslovna docentica, dr. sc. Željko CVETNIC, dr. med. vet., akademik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Mario OSTOVIC, dr. med. vet., docent, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

incidencija kampilobakterioze te porast broja slučajeva kampilobakter-pozitivnih trupova peradi. Uvođenjem zaštitnih mjera koje su uključivale: pooštene biosigurnosne mjere na farmama te obvezno smrzavanje mesa tovnih pilića podrijetlom od dokazano pozitivnih jata, na Islandu je 2000. godine broj oboljelih ljudi od kampilobakterioze i postotak pozitivnih trupova znatno smanjen (Stern i sur., 2003.).

Luber i Bartelt (2006.) su dokazali da je broj ovih mikroorganizama na površinama mesa tovnih pilića značajno veći u odnosu na unutrašnjost. Svježa piletna često je onečišćena bakterijama roda *Campylobacter*, a njihov broj može iznositi i više od 10^8 cfu/g (Engl. colony forming unit/gram). Istraživanjem ambalaže na tržištu u koju su bili pakirani pileći trupovi, dokazana je njihova prisutnost i na vanjskim dijelovima ambalaže, koja isto tako može postati izvor križnog onečišćenja (Burgess i sur., 2005.). Rezultati istraživanja Mikulić i sur. (2016.) pokazali su visoku prevalenciju termotolerantnih kampilobakteria (73.86%) u svježem pilećem mesu na području Republike Hrvatske, s *C. jejuni* (53.53%) kao najzastupljenijom vrstom, a slijedila ju je *C. coli* (15.35%), što je u suglasju i s rezultatima drugih istraživanja provedenim kako u zemljama Europske unije tako i u ostatku svijeta.

Bakterije roda *Campylobacter* ne rastu pri vrijednostima sobne temperature, tako da glavnu opasnost u domaćinstvu i ugostiteljstvu predstavlja križno onečišćenje svježe i hrane spremne za potrošnju kako izravno tako i neizravno preko ruku, radnih površina, kuhinjskih pomagala, kao i nedovoljno toplinski obrađena onečišćena svježa hrana. Priprema svježeg mesa na roštilju, uslijed križnog onečišćenja svježeg i pečenog mesa, kao i nedovoljna toplinska obrada hrane prilikom roštiljanja, važni su čimbenici rizika (Allerberger i sur., 2003.). Iako su po prirodi termotolerantni, kampilobakteri

se lako inaktiviraju toplinskom obradom i ne mogu preživjeti postupak pasterizacije i uobičajenu kulinarsku pripremu (Konkel i sur., 1998.). Uporaba nedovoljno toplinski obrađene pileće jetre jedan je od prepoznatih rizika od pojave kampilobakterioze u ljudi (Schorr i sur., 1994.). U istraživanju mogućnosti križnog onečišćenja tijekom pripreme ručka od svježeg pilećeg mesa, bakterije *Campylobacter* izdvojene su s ruku osoba, drški pećnice, radne površine i daske u onim kuhinjama gdje su istovremeno ove bakterije izdvojene i u uzorcima pilećeg mesa (Gorman i sur., 2002.). Zanimljivo je da prilikom istraživanja kuhinjskih krpa u domaćinstvima u Velikoj Britaniji, *Campylobacter* spp. nije izdvojen u 1.009 pretraženih uzoraka (ACMSF, 2005.). Broj kampilobakteria u kuhinji može se učinkovito smanjiti nizom higijenskih mjera poput temeljitog čišćenja radnih površina, suđa i pomagala, uz uporabu deterdženta, vruće vode i dezinficijensa. Preporučenim mjerama u domaćinstvu za uništavanje patogenih bakterija, kao što su, primjerice, salmonele, također se inaktiviraju i kampilobakteri. Cogan i sur. (1999.) ustanovili su da je uporaba vruće vode i dezinficijensa (hipoklorit) učinkovitija u čišćenju onečišćenih radnih površina od vruće vode i deterdženta. Važan čimbenik u sprječavanju širenja kampilobakterioze u ljudi jest temeljito i redovito pranje ruku nakon rukovanja i obrade svježeg mesa. Pranje ruku sapunom smanjuje opasnost od želučano-crijevnih oboljenja za gotovo 50% (Curtis i Cairncross, 2003.). Tako Tofant (2005.) navodi da je higijena ruku u veterinarskoj praksi važan čimbenik u svim djelatnostima.

Utvrđeno je da u uzorcima svježeg pilećeg mesa kampilobakteri mogu preživjeti u hladnjaku, u vlažnim uvjetima, pri temperaturi od 4°C više tjedana (Haddad i sur., 2009.), dok u vodenom okolišu pri 20°C prežive do nekoliko dana (Terzieva i McFeters, 1991.).

Pohranjivanjem trupova tovnih pilića pri temperaturi smrzavanja od -20 °C značajno se smanjuje broj kampilobaktera, pri čemu je on relativno postojan od 31-og do 220-og dana nakon smrzavanja (Georgsson i sur., 2006.). Mikroaerofilni *Campylobacter* spp. osjetljivi su na kisik i njegove reduksijske produkte te tako oksidativni stres pridonosi uništavanju ovih bakterija tijekom postupaka smrzavanja i odmrzavanja (Stead i Park, 2000.). Optimalna pH vrijednost za njihov rast iznosi 6,5-7,5, dok im je rast onemogućen pri pH manjem od 4,9 ili višem od 9,0. Najmanji aktivitet vode potreban za rast iznosi $\geq 0,987$ (2% NaCl) (Silva i sur., 2011.). Ovi mikroorganizmi su osjetljivi na isušivanje, no određeno vrijeme mogu preživjeti u suhoj drvenoj kuhinjskoj dasci za rezanje (Cools i sur., 2005.). U koži pilećeg mesa, u odnosu na samo meso, bakterije preživljavaju u većem broju pri temperaturi od 4 °C, u usporedbi s temperaturom od -3 °C tijekom 11 dana pa je prevalencija kampilobakteria veća u proizvodima od pilećeg mesa s kožom, nego u otkoženom mesu (Davis i Conner, 2007.).

Ostale vrste hrane isto tako mogu biti onečišćene kampilobakterima. Za razliku od mesa tovnih pilića, pureće (Zhao i sur., 2001.), pače i gušće meso sadrže znatno manji broj ovih bakterija (Kwiatek i sur., 1990.). Potrošnja sirovog ili toplinski nedovoljno obrađenog mlijeka, često prilikom posjeta i kušanja mlijeka na samim farmama, predstavlja veliki uzrok izbijanja kampilobakterioze u ljudi (Gillespie i sur., 2003.). Mlijeko je obično nedovoljno toplinski obrađeno i/ili onečišćeno izmetom, a prisutnost bakterija dokazana je i kod pojave mastitisa u krava. Čuk i sur. (1987.) su utvrdili da u kiselomliječnim proizvodima, poput jogurta, kampilobakteri nisu sposobni preživjeti. Prevalencija kampilobakteria u svježem goveđem, janjećem i svinjskom mesu manja je od one u mesu peradi (Little i sur., 2008.), iako su kampilobakteri

čest nalaz prilikom pretraga izmeta stoke (Stanley i Jones, 2003.). Smatra se da je prisutnost ovih bakterija u uzorcima školjkaša posljedica onečišćenja vode (Wilson i Moore, 1996.), a čest nalaz *C. lari* u različitim vrstama morske hrane dovodi se u vezu s galebovima kao rezervoarima uzročnika koji izmetom onečišćuju vodu koja tada predstavlja rizik za širenje bolesti (Moore i sur., 2002.). Voće i povrće može u rijetkim slučajevima biti onečišćeno kampilobakterima kao posljedica uporabe stajskog gnojiva ili onečišćene vode te je u Nizozemskoj utvrđena prevalencija od 0,23% (Verhoeff-Bakkenes i sur., 2011.).

Različita istraživanja su pokazala da prisutnost češnjaka u hrani djeluje inaktivirajuće na kampilobaktere. Tako su nakon umjetnog onečišćenja maslaca bez češnjaka kampilobakteri preživjeli u proizvodu, za razliku od onih inokuliranih u maslac s dodatkom češnjaka gdje se naknadno više nisu mogli izdvojiti (Zhao i sur., 2000.). Ustanovljeno je da koncentrat češnjaka, odnosno njegovi organosumporni sastojci i polifenoli imaju baktericidni učinak na *C. jejuni* (Lu i sur., 2011.), a dialil-sulfit jaki antimikrobni učinak kako na bakterije tako i na stvorene biofilmove (Lu i sur., 2012.). Abramović i sur. (2012.) dokazali su učinak ekstrakta ružmarina u smanjenju broja *C. jejuni* u pilećem mesu.

Kampilobakterioza u ljudi i njezino liječenje

Istraživanjem Black i sur. (1988.) provedenim na zdravim dobrovoljcima utvrđena je infektivna doza *C. jejuni* od 800 bakterijskih stanica, dok Robinson (1981.) u prikazu slučaja navodi infektivnu dozu od 500 i manje organizama. Hofreuter i sur. (2006.) sekvensiranjem genoma izrazito patogenog soja *C. jejuni* 81-176 utvrdili su njegove posebne genetske osobine odgovorne za razliku u patogenosti između sojeva iste vrste.

Važna odlika kampilobakterioze jest njezina sezonska pojavnost, koja svoj vrhunac u područjima umjerene klime doseže u kasno proljeće i rano ljeto (svibanj do srpanj) (Nylen i sur., 2002.). Postoji više mogućih objašnjenja za pojavu sezonalnosti. Tako je istraživanje u Danskoj pokazalo da su klimatski uvjeti kao što su visoke temperature četiri tjedna prije nastupa infekcije mogući način za predviđanje pojavnosti oboljenja u ljudi (Patrick i sur., 2004.). Osim toga, sezonska pojavnost kampilobakterioze povezuje se i s većom prevalencijom onečišćenog pilećeg mesa, migracijom divljih ptica, zatim većim brojem kućnih muha i ostalih kukaca, kao i novookočenih štenaca (Humphrey i sur., 2007.), promjenama u ljudskim aktivnostima tijekom toplijeg razdoblja, poput roštiljanja i povećane rekreacije u prirodi (Nylen i sur., 2002.).

Kampilobakterioza kod osoba zdravog imunološkog sustava je blaga, samolimitirajuća bolest, koja se očituje vodenastim i ili krvavim proljevom (Altekruš i sur., 1999.). Uobičajeno razdoblje inkubacije iznosi 24-72 sata, a može se produžiti i do tjedan dana. Najvažniji klinički simptomi uključuju akutni proljev, praćen jakim abdominalnim grčevima i povišenom tjelesnom temperaturom, s mogućom glavoboljom i bolovima u mišićima. Proljev je u početku vodenast, a kasnije često postaje krvav. Najintenzivniji simptomi traju prvih 24-48 sati uz postupno smirivanje kroz daljnjih tjedan dana. Pacijenti mogu izlučivati uzročnika izmetom i do nekoliko tjedana nakon infekcije. Bolest je teško klinički razlikovati od ostalih akutnih crijevnih infekcija, poput salmoneloze i šigeloze pa se konačna dijagnoza temelji na dokazu bakterija u izmetu bolesnika (Blaser, 1997.). Naknadne posljedice bolesti mogu nastati kao komplikacija gastroenteritisa te rjeđe zbog pretjerane imunološke reakcije organizma. Kao posljedica širenja bakterija izvan želučano-

crijevnog sustava javljaju se: kolecistitis, pankreatitis, peritonitis, kao i jaka želučano-crijevna krvarenja. Rijetko se javljaju: septikemija, meningitis, artritis, osteomijelitis i endokarditis (Acheson i Allos, 2001.). Kao posljedica infekcije mogu se javiti i sljedeći sindromi: Guillain-Barré sindrom, hemolitično-uremični sindrom (HUS) i Miller-Fisher sindrom koji se smatra jednim od podtipova Guillain-Barré sindroma. Guillain-Barré sindrom je akutna, bilateralna, ascendentna paraliza koja se tipično javlja 1-3 tjedna nakon pojave proljeva (Allos i sur., 1998.). *Campylobacter*-inducirani reaktivni artritis, ili Reiter-ov sindrom, javlja se u prosjeku dva tjedna nakon pojave proljeva i ubičajeno zahvaća više od jednog zgloba, najčešće koljena, gležnjeve, zglobove ruku i donji dio leđa (Hannu i sur., 2002.). Uz termotolerantne *Campylobacter* spp. koji uzrokuju opisane simptome kampilobakterioze. *C. fetus* može prouzročiti infekciju reproduktivskih organa te posljedično pobačaj i neplodnost, prije svega u goveda i ovaca, zatim septikemiju i pobačaj u ljudi (Humphrey i sur., 2007.) te rjeđe intestinalnu kampilobakteriozu u ljudi (Bullman i sur., 2011.). Pojedine vrste opisane su kao uzročnici periodontalnih oboljenja u ljudi (*C. rectus*, *C. showae*, *C. gracilis*, *C. rectus*), dok za primjerice vrste *C. lanienae* i *C. insulaenigrae* nije dokazana povezanost s oboljenjima ljudi i ili životinja (Humphrey i sur., 2007.).

U razvijenim zemljama od kampilobakterioze najčešće obolijevaju djeca do jedne godine starosti te mlađi u dobi od 15 do 30 godina. U zemljama u razvoju većinom obolijevaju djeca u dobi do pet godina starosti te stopa obolijevanja opada s dobi, vjerojatno zbog stvaranja imuniteta (Blaser, 1997.).

Obolijevanje dojenčadi posljedica je još nedovoljno razvijenog imunološkog sustava i prvog susreta s bakterijom. Češće obolijevanje mlađih muškaraca, u odnosu na istu starosnu skupinu žena,

dovodi se u vezu s nepravilnim navikama u postupanju s hranom. Smrtnost kao posljedica kampilobakterioze je rijetka i zabilježena je najčešće kod imunokompromitiranih pacijenata, djece i starijih osoba. Izbijanja zaraze su rijetka i dovode se u vezu s potrošnjom sirovog mlijeka i onečišćenim vodama. Oboljenja su uglavnom sporadične prirode i javljaju se prije svega zbog nepravilne pripreme onečišćene hrane, sirovog mlijeka, onečišćene vode i svježeg povrća, uslijed kontakta s inficiranim psima i mačkama, kao i nakon inozemnih putovanja (Altekruše i sur., 1999.).

Liječenje kampilobakterioze je simptomatsko i obično podrazumijeva rehidraciju i nadoknadu elektrolita, dok se liječenje antibioticima (makrolidima, tetraciklinima, eritromicinom i (fluoro)kinolonima) provodi samo u težim slučajevima bolesti. Istraživanju liječenja kampilobakterijskog enterokolitisa na 60-ero oboljele djece u dobi od jednog mjeseca do 7 godina starosti, jednokratno primijenjen azitromicin pokazao se sigurnim i učinkovitim u liječenju u usporedbi s višekratnim dozama eritromicina koje predstavljaju lijek izbora u ovoj skupini bolesnika (Vukelić i sur., 2003.). Česta je pojava otpornosti kampilobaktera na eritromicin, (fluoro)kinolone i tetracikline, što jako otežava liječenje prilikom pojave težih slučajeva bolesti. Utvrđena je jaka veza između pojave otpornosti i uporabe antibiotika u intenzivnim uzgojima životinja. Uporaba antibiotika, posebno fluorokinolona, kao promotora rasta peradi u intenzivnim uzgojima Europe i Sjeverne Amerike rezultirala je porastom antimikrobne otpornosti (Alfredson i Korolik, 2007.). Prema podatcima istraživanja otpornosti izolata *C. jejuni* iz svježeg pilećeg mesa na tržištu Danske najveća otpornost utvrđena je za tetracikline, zatim nalidiksičnu kiselinu te ciprofloxacin, dok je otpornost na fluorokinolone u opadanju zbog ograničenja njihove

primjene u industriji (Andersen i sur., 2006.).

Epidemiološka istraživanja pokazuju da se kao rezultat infekcije kampilobakterima može razviti imunitet, koji može sprječiti pojavu simptoma bolesti, ali neće nužno djelovati zaštitno u sprječavanju kolonizacije. Otpornost na kampilobakterijski enteritis stvara se kod osoba koje su često profesionalno izložene bakterijama roda *Campylobacter*, kao što su doktori veterinarske medicine, radnici na farmama ili u klaonicama (Wassenaar i Blaser, 1999.).

U razdoblju od 1994. do 2002. godine kampilobakterioza je dokazana u 1.632 bolesnika hospitalizirana u klinici za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević, Zagreb te je po kliničkim osobitostima bila jednaka onima opisanim u drugim razvijenim zemljama. *C. jejuni* utvrđen je u 71,7% slučajeva, a *C. coli* u njih 28,3%. Najveći broj oboljelih zabilježen je u skupini djece mlađe od tri godine, potom u skupini od 18 do 29 godina, pri čemu su muškarci prevladavali u svim skupinama osim u onoj s bolesnicima starijim od 60 godina. Najveći broj oboljelih hospitaliziran je tijekom lipnja i kolovoza (Balen Topić i sur., 2007.). Istraživanja provedena tijekom 2007. godine na području Primorsko-goranske županije dokazala su incidenciju kampilobakterioze od 116,24 na 100.000 stanovnika u skupini bolesnika od 20 do 29 godina i od 669,21 na 100.000 u djece dobi do 4 godine. *C. jejuni* potvrđen je u 90% bakterijskih izolata, a *C. coli* u preostalih 10%, s najviše primoizolata tijekom srpnja i kolovoza (Đurić i sur., 2007.).

Sažetak

U zemljama Europske unije kampilobakterioza je najučestalija bolest koja se prenosi hranom, a kao najčešći izvor zaraze smatra se svježe pileće meso. U Republici Hrvatskoj ova zoonoza je svrstana na drugo mjesto po

učestalosti nakon salmoneloze. S obzirom na to da se kampilobakteri lako inaktiviraju toplinskom obradom, glavni rizik od obolijevanja prilikom pripreme hrane predstavlja križno onečišćenje sveže i hrane spremne za potrošnju kako izravno tako i neizravno. Broj kampilobaktera na onečišćenim površinama učinkovito se smanjuje uobičajenim higijenskim mjerama u domaćinstvu, dok se broj u pilećem mesu smrzavanjem značajno smanjuje. U područjima umjerene klime bolest se u ljudi najčešće javlja u razdoblju od svibnja do srpnja, uglavnom u obliku sporadičnih slučajeva. Obolijevaju prije svega djeca do jedne godine starosti te mladi u dobi od 15 do 30 godina. Bolest se očituje pojavom vodenastog i/ili krvavog proljeva praćenog jakim abdominalnim grčevima i povišenom temperaturom, s mogućom glavoboljom i bolovima u mišićima, uz rijetko naknadne posljedice. Konačna dijagnoza temelji se na dokazu bakterija u izmetu bolesnika. Liječenje je simptomatsko, a antibiotici se primjenjuju samo u težim slučajevima.

Ključne riječi: termotolerantni *Campylobacter* spp., hrana, klinička slika, liječenje

Literatura

1. ABRAMOVIĆ, H., P. TERPINC, I. GENERALIĆ, D. SKROZA, A. KLANČNIK, V. KATALINIĆ and S. SMOLE MOŽINA (2012): Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 4, 1-8.
2. ACHESON, D. and B. M. ALLOS (2001): *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1201-1206.
3. ACMSF (2005): Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food: Second Report on *Campylobacter*. Food Standards Agency. Aviation House, 125 Kingsway, London. FSA/0986/0605.
4. ALFREDSON, D. A. and V. KOROLIK (2007): Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 123-132.
5. ALLERBERGER, F., N. AL-JAZRAWI, P. KREIDL, M. P. DIERICH, G. FEIERL, I. HEIN and M. WAGNER (2003): Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infection* 31, 19-23.
6. ALLOS, B. M., F. T. LIPPY, A. CARLSEN, R. G. WASHBURN and M. J. BLASER (1998): *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 263-268.
7. ALTEKRUSE, S. F., J. S. NORMAN, P. I. FIELDS and D. L. SWERDLOW (1999): *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28-35.
8. ANDERSEN, S. R., P. SAADBYE, N. M. SHUKRI, H. ROSENQUIST, N. L. NIELSEN and J. BOEL (2006): Antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* isolated from raw poultry meat at retail level in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 250-255.
9. BALEN TOPIĆ, M., A. BEUS, B. DESNICA, N. VICKOVIĆ, V. ŠIMIĆ i D. ŠIMIĆ (2007): Epidemiološke osobitosti kampilobakterioza u hospitaliziranih bolesnika. *Infektološki Glasnik* 27, 15-22.
10. BLACK, R. E., M. M. LEVINE, M. L. CLEMENTS, T. P. HUGHES and M. J. BLASER (1988): Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157, 472-479.
11. BLASER, M. J. (1997): Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* 176, 103-105.
12. BULLMAN, S., CORCORAN, D., O'LEARY, J., O'HARE, D., LUCEY, B. and R.D. SLEATOR (2011): Emerging dynamics of human campylobacteriosis in Southern Ireland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 248-253.
13. BURGESS, F., C. L. LITTLE, G. ALLEN, K. WILLIAMSON and R. T. MITCHELL (2005): Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the external packaging of raw meat. *J. Food. Protect.* 68, 469-475.
14. COGAN, T. A., S. F. BLOOMFIELD and T. J. HUMPHREY (1999): The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 354-358.
15. COOLS, I., M. UYTTENDAELE, J. CERPENTIER, E. D'HAESE, H. J. NELIS and J. DEBEVERE (2005): Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 418-423.
16. CURTIS, V. and S. CAIRNCROSS (2003): Effect of washing hands with soap on diarrhoea risk in the community: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 3, 275-281.
17. ĆUK, Z., A. ANNAN-PRAH, M. JANC and J. ZAJC-SATLER (1987): Yoghurt: an unlikely source of *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 201-205.
18. DAVIS, M. A. and D. E. CONNER (2007): Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. *Poultry Sci.* 86, 765-767.
19. ĐURIĆ, D., P. GREGOROVIĆ-KESOVJAJA, M. ABRAM, B. TIĆAC i D. VUČKOVIĆ (2007): Učestalost i sezonska raspodjela izvanbolničke kampilobakterioze u Primorsko-goranskoj županiji (Hrvatska) tijekom 2007. godine. *Medicinski Glasnik* 5, 79-85.
20. GEORGSSON, F., A. E. THORNORKELSSON, M. GEIRSDÓTTIR, J. REIERSEN and N. J. STERN (2006): The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.* 23, 677-683.

21. GILLESPIE, I. A., G. K. ADAK, S. J. O'BRIEN and F. J. BOLTON (2003): Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992–2000. *Epidemiol. Infect.* 130, 461-468.
22. GORMAN, R., S. BLOOMFIELD and C. C. ADLEY (2002): A study of cross-contamination of foodborne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 143-150.
23. HADDAD, N., C. M. BURNS, J. M. BOLLA, H. PRÉVOST, M. FÉDÉRIGHI, D. DRIDER and J. M. CAPPELIER (2009): Long-term survival of *Campylobacter jejuni* at low temperatures is dependent on polynucleotide phosphorylase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7310-7318.
24. HANNU, T., L. MATTILA, H. RAUTELIN, P. PELKONEN, P. LAHDENNE, A. SIITONEN and M. LEIRISALO-REPO (2002): *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford)* 41, 312-318.
25. HOFREUTER, D., J. TSAI, R. O. WATSON, V. NOVIK, B. ALTMAN, M. BENITEZ, C. CLARK, C. PERBOST, T. JARVIE, L. DU and J. E. GALÁN (2006): Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect. Immun.* 74, 4694-4707.
26. HUMPHREY, T., S. O'BRIEN and M. MADSEN (2007): Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 237-257.
27. KONKEL, M. E., B. J. KIM, J. D. KLENA, C. R. YOUNG and R. ZIPRIN (1998): Characterisation of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 66, 3666-3672.
28. KWIAŁEK, K., B. WOJTON and N. J. STERN (1990): Prevalence and distribution of *Campylobacter* spp. on poultry and selected red meat carcasses in Poland. *J. Food Protect.* 53, 127-130.
29. LITTLE, C. L., J. F. RICHARDSON, R. J. OWEN, E. DE PINNA and E. J. THRELFALL (2008): *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. *Food Microbiol.* 25, 538-543.
30. LU, X., B. A. RASCO, J. M. F. JABAL, D. E. ASTON, M. LIN and M. E. KONKEL (2011): Investigating antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) concentrate and garlic-derived organosulfur compounds on *Campylobacter jejuni* by using fourier transform infrared spectroscopy, raman spectroscopy, and electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5257-5269.
31. LU, X., D. R. SAMUELSON, B. A. RASCO and M. E. KONKEL (2012): Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1915-1926.
32. LUBER, P. and E. BARTELTT (2006): Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. *J. Appl. Microbiol.* 102, 313-318.
33. MIKULIĆ, M., A. HUMSKI, B. NJARI, M. OSTOVIC and Ž. CVETNIĆ (2016): Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* species in chicken meat in Croatia and multilocus sequence typing of a small subset of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Food Technol. Biotechnol.* (u tisku: <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4647>).
34. MP i HAH (Ministarstvo poljoprivrede u suradnji s Hrvatskom agencijom za hranu) (2013): Godišnje izvješće o rezultatima analiza službenih kontrola hrane i hrane za životinje u 2012. godini. (dostupno na: http://www.hah.hr/pdf/izvjesce_laboratorijska_za_2012_godinu.pdf) [15. srpnja 2016].
35. MOORE, J. E., D. GILPIN, E. CROTHERS, A. CANNEY, A. KANEKO and M. MATSUDA (2002): Occurrence of *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. in seagulls (*Larus* spp.). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2, 111-114.
36. NYLEN, G., F. DUNSTAN, S. R. PALMER, Y. ANDERSSON, F. BAGER, J. COWDEN, G. FEIERL, Y. GALLOWAY, G. KAPPERUD, F. MEGRAUD, K. MOLBAK, L. R. PETERSEN and P. RUUTU (2002): The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol. Infect.* 128, 383-390.
37. OIE WAHIS (Organisation for Animal Health World Animal Health Information Database Interface) (2016). (dostupno na: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php?Country_information/Zoonoses) [16. kolovoza 2016].
38. PATRICK, M. E., L. E. CHRISTIANSEN, M. W. WAINØ, S. ETHELBERG, H. MADSEN and H. C. WEGENER (2004): Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7474-7480.
39. ROBINSON, D. A. (1981): Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J.* 282, 1584.
40. SCHORR, D., H. SCHMID, H. L. RIEDER, A. BAUMGARTNER, H. VORKAUF and A. BURNENS (1994): Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 196, 327-337.
41. SILVA, J., D. LEITE, M. FERNANDES, C. MENA, P. A. GIBBS and P. TEIXEIRA (2011): *Campylobacter* spp. as a food borne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 200, 1-12.
42. STANLEY, K. and K. JONES (2003): Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 94, 104-113.
43. STEAD, D. and S. F. PARK (2000): Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3110-3112.
44. STERN, N. J., K. L. HIETT, G. A. ALFREDSSON, K. G. KRISTINSSON, J. REIERSEN, H. HARDARDOTTIR, H. BRIEM, E. GUNNARSSON, F. GEORGSSON, R. LOWMAN, E. BERNDTSON, A. M. LAMMERDING, G. M. PAOLI and M. T. MUSGROVE (2003): *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol. Infect.* 130, 23-32.

45. TERZIEVA, S. I. and G. A. MCFETERS (1991): Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Can. J. Microbiol.* 37, 785-790.
46. TOFANT, A. (2005): Higijena ruku. *Meso* 7, 41-45.
47. VELLINGA, A. and F. VAN LOOCK (2002): The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 19-22.
48. VERHOEFF-BAKKENES, L., H. A. JANSEN, P. H. VELD, R. R. BEUMER, M. H. ZWIETERING and F. M. VAN LEUSDEN (2011): Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 406-412.
49. VUKELIĆ, D., D. PAVIĆ-SLADOLJEV, D. BOČINOVIĆ, A. BAĆE i B. BENIĆ (2003): Liječenje gastroenterokolitisa uzrokovano bakterijama roda *Campylobacter* u dječjoj dobi. *Medicus* 12, 133-137.
50. WASSENAAR, T. M. and M. J. BLASER (1999): Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes. Infect.* 1, 1023-1033.
51. WILSON, I. G. and J. E. MOORE (1996): Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 116, 147-153.
52. ZHAO, C., B. GE, J. DE VILLENA, R. SUDLER, E. YEH, S. ZHAO, D. G. WHITE, D. WAGNER and J. MENG (2001): Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from Greater Washington DC area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5431-5436.
53. ZHAO, T., M. P. DOYLE and D. E. BERG (2000): Fate of *Campylobacter jejuni* in butter. *J. Food Protect.* 63, 120-122.

Thermotolerant *Campylobacter* spp. – Causative Agents of Campylobacteriosis (Part II.)

Marina MIKULIĆ, DVM, PhD, Post-doctoral Researcher, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Mario OSTOVIĆ, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

In European Union Member States, campylobacteriosis is the most prevalent food-borne disease with poultry meat as the most common cause of infection. In the Republic of Croatia, campylobacteriosis ranks as the second most prevalent zoonosis, immediately following salmonellosis. As campylobacters are easily inactivated by thermal processing, the main risk of illness while preparing food is the direct or indirect cross-contamination of fresh food and food ready for consumption. *Campylobacter* counts on contaminated surfaces can be efficiently reduced by general household hygiene measures, while their count in poultry meat is significantly reduced by freezing. In temperate climate areas, the

disease usually occurs in humans from May to July, mostly as sporadic cases. Children under one year of age and young individuals aged 15-30 years are most frequently involved. The clinical picture of campylobacteriosis is predominated by watery and/or bloody diarrhoea accompanied by severe abdominal cramps and fever, possibly with headache and myalgia, rarely with later sequels. The definitive diagnosis is based on the evidence of bacteria in the patient's stool. Treatment is symptomatic and antibiotics are administered only in severe cases.

Key words: Thermotolerant *Campylobacter* spp., Food, Clinical picture, Treatment

Mehanizam nastanka masne jetre tijekom prijelaznog razdoblja u mliječnih krava

R. Peša, Romana Turk, D. Đuričić, I. Folnožić, D. Gračner, H. Valpotić,
I. Butković, M. Kovačić i M. Samardžija*



Uvod

Jedan od najvažnijih zdravstvenih problema visokoproduktivnih mliječnih krava je poremećaj energetskog statusa, što posljedično može prouzročiti nastanak masne jetre. Masna jetra (hepatička lipidoza) je glavni metabolički poremećaj životinja (Gruffat i sur., 1996., Goff i Horst, 1997.). Različiti autori navode da se zamašenje jetre različitog stupnja može ustanoviti u preko 60% krava u ranoj laktaciji. Budući da je glavni uzrok ovog metaboličkog poremećaja nepravilna hranidba (nepravilno sastavljanje obroka za visoku proizvodnju mlijeka), onda na farmama koje ne provode redovito optimizaciju obroka u peripartalnom periodu, ovaj postotak može biti i znatno veći. Vrlo je bitno pravilno uvesti krave u laktaciju, što podrazumijeva pravilnu hranidbu tijekom gravidnosti, suhostaja i prijelaznog perioda. Zamašenje jetre povezano je i s drugim zdravstvenim poremećajima kao što su: ketoza, dislokacija sirišta, indigestije, poremećaji reprodukcije te sa smanjenjem proizvodne sposobnosti, po-

većanjem postotka izlučenih grla, prinudnim klanjima, kao i uginućima. U skladu s prethodno navedenim može se zaključiti da masna jetra može prouzročiti velike ekonomske gubitke, stoga predstavlja jednu od najprisutnijih ekonomskih bolesti visokoproduktivnih mliječnih krava. Mogućnost nastanka masne jetre kod mliječnih krava najveća je do 40. dana nakon teljenja (Grummer, 1993.).

Krave koje imaju vrlo izražen vrhunac laktacije uglavnom nisu sposobne tijekom tog razdoblja konzumirati dostatnu količinu hrane pa se kao posljedica javlja negativni energetski status (Engl. *Negative energy balance; NEB*). Ako krave imaju ujednačenu laktacijsku krivulju i manje izražen vrhunac laktacije, njihove energetske potrebe u tom razdoblju će biti lakše zadovoljiti te će biti manje podložne metaboličkim bolestima i NEB-u. Nakon vrhunca laktacije, slijedi postupni pad proizvodnje mlijeka, kao rezultat smanjenja broja sekretornih stanica i njihove aktivnosti.

Roland PEŠA, dr. med. vet., dr. sc. Romana TURK, mag. biochem., docentica, dr. sc. Ivan FOLNOŽIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Damjan GRAČNER, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., docent, Ivan BUTKOVIĆ, dr. med. vet, asistent, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA*, dr. med. vet., redoviti profesor (dopisni autor, e-mail: smarko@vrf.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Veterinarska stanica Đurđevac, Hrvatska, dr. sc. Mislav KOVAČIĆ, dr. med. vet., Mount-Trade d.o.o., Garešnica, Hrvatska

U sekretnim stanicama mlijecne žlijezde sintetiziraju se mlijecna mast, lakoza i većina bjelančevina. Tri su izvora viših masnih kiselina za sintezu mlijecne masti: sinteza u mlijekojoj žlijezdi iz octene kiseline i beta hidroksimaslaćne kiseline (BHB), zatim razgradnja triglicerida iz hilomikrona i lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL) te slobodne masne kiseline (SMK) iz krvi. Većina bjelančevina se sintetizira iz aminokiselina nastalih razgradnjom bjelančevina, a lakoza se sintetizira iz glukoze (Filipović i sur., 2007.).

Zbog naglog povećanja potreba, prilagodba organizma mora biti brza inače dolazi do pojave metaboličkih poremećaja. Prilagodbe na laktaciju podrazumijevaju povećani unos hrane i vode, povećanje kapaciteta probavnog sustava s povećanom sposobnošću resorpcije hranjivih tvari, povećani opseg lipolize i smanjeni opseg lipogeneze, povećani opseg glukoneogeneze i glikogenolize, utilizaciju acetata za energetske potrebe, mobilizaciju tjelesnih bjelančevina, povećani opseg resorpcije minerala i mobilizaciju njihovih rezervi te povećani opseg resorpcije vode i povećanje volumena plazme.

Glukoza u krvi preživača ponajprije ovisi o glukoneogenezi. Ugljikohidrate koji se unose hranom fermentacija u predželudcima goveda prevodi u niže masne kiseline (NMK) pa je to razlog zašto se samo mali dio glukoze resorbira u krvotok kroz sluznicu predželudaca. Zbog toga koncentracija glukoze u krvi preživača znatno je niža nego u nepreživača što dovodi do pada koncentracije inzulina te porasta koncentracije glukagona, s posljedičnim povećanjem lipolize i β -oksidacije masnih kiselina iz kojih nastaje velika količina acetil-CoA. Nastali acetil-CoA ulazi u ciklus limunske kiseline, ali samo u količini koja je ovisna o raspoloživosti oksalacetata (OA), a koja ovisi o količini glukoze. Preostali se

acetil-CoA preusmjerava u ketogenezu, što je osnova za stvaranje ketonskih tijela. Obilježje metabolizma preživača je i niža koncentracija OA u mitohondrijima, što isto tako pridonosi nastanku ketonskih tijela. Ključni enzim ketogeneze-mitohondrijska hidroksimetilglutaril koenzim A sintaza (HMG CoA-sintaza) gotovo je isključivo ograničen na mitohondrije jetre. Aktivnost HMG CoA-sintaze povećava se pod utjecajem cikličnog adenozin-monofosfata, glukokortikoida te tijekom gladovanja, a smanjuje ju inzulin i ponovno hranjenje. Određene se količine BHB-a sintetiziraju i u sluznici predželudaca iz maslačne kiseline. Uslijed lipolize u krvi raste koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) koje koristi većina tkiva (u najvećoj mjeri jetra, skeletni i srčani mišić) za dobivanje energije putem beta-oksidacije u mitohondrijima. U jetri se iz SMK sintetiziraju triglyceridi te se oslobađaju u krvotok kao sastavni dio VLDL-a. Preživači imaju ograničenu sposobnost otpuštanja VLDL-a u krvotok pa se u suvišku SMK sintetizira velika količina triglycerida u jetri, koji se ne mogu u potpunosti izlučiti u krvotok. Posljedica ovog stanja je nakupljanje triglycerida u stanicama jetre te nastanak zamašćenja jetre u mlijecnih krava prije porođaja i u početku laktacije (Filipović i sur., 2007.). Tako je Reid (1980.) tjedan dana nakon teljenja ustvrdio u 48% holštajnskih krava srednje te u 15% krava jako zamašćenje jetre. Acorda i sur. (1995.) ustvrdili su zamašćenje jetre u 41 od 158 holštajnsko-frizijskih krava.

Za vrijeme tranzicijskog perioda naglo se povećaju potrebe za energijom, a nedovoljan je unos hranjivih tvari (Butler, 2012.). Da bi se osigurao pravilan promet masti i energije, a nakupljanje triglycerida u jetri i ketogeneza sveli na minimum, neophodno je da hepatociti kontinuirano budu snabdjeveni glukoplastičnim tvarima (ugljikohidratima i aminokiselinama). U uvjetima NEB-a, ravnoteža iz-

među glukoplastičnih i energetskih tvari polako se remeti, tako da se zbog pojačane lipogeneze i nakupljanja triglicerida u hepatocitima ograničava glukoneogena sposobnost hepatocita. Od ukupne količine sintetizirane glukoze u prijelaznom periodu, svega se 10% koristi za potrebe bazalnog metabolizma, dok se sve ostalo koristi za sintezu laktoze.

Butler (2012.) navodi da tijekom perioda kasne laktacije, a naročito tijekom perioda suhostaja, krava unosi veću količinu energije nego što je potrebno za zadovoljenje uzdržnih potreba i potreba teleta te se višak energije deponira u obliku masnog tkiva. Količina deponirane energije i njezino kasnije iskorištavanje ovise, ne samo o količini energije unijete hranom, već i o adaptivnoj sposobnosti grla.

U kasnom suhostaju i ranoj laktaciji dolazi do znatnog smanjenja unosa hrane. Zbog nemogućnosti unosa dovoljne količine hrane u prijelaznom periodu, proizvodnja mlijeka se održava najvećim dijelom na račun tjelesnih rezervi krave, pri čemu često dolazi do poremećaja zdravstvenog stanja životinje. Metabolizam ugljikohidrata i masti u visokoj gravidnosti obilježava povećana glukoneogeneza u jetri i smanjenje periferne potrošnje glukoze, nepromijenjena ili smanjena potrošnja acetata i umjerena mobilizacija masnih kiselina iz masnog tkiva praćena povećanjem njihove potrošnje u perifernim tkivima. Cilj ovakve metaboličke konstrukcije jest da se plodu osiguraju dovoljne količine glukoze (kao izvora energije) i aminokiselina (kao prekursora za rast), dok je organizam majke usmјeren na potrošnju masnih kiselina i ketonskih tijela kao izvora energije. Postpartalno dolazi do inverzije koncentracije glukoze i masnih kiselina, što ukazuje na veliku potrošnju glukoze u mlijecnoj žlijezdici, dok se sistemski metabolizam usmjerava u pravcu korištenja lipida kao izvora

energije, s ciljem da se u metaboličkom smislu podrži laktacija (Savić, 2010.). Na početku laktacije, hepatociti bivaju „zagušeni“ masnim kiselinama koje pristižu iz masnog tkiva zbog intenzivne mobilizacije masti te se u skladu s time smanjuje i njihov kapacitet za glukoneogenezu. Nedovoljna glukoneogeneza u jetri i pored smanjenja periferne potrošnje glukoze ne uspijeva zadovoljiti rastuće potrebe mlijecne žlijezde za glukozom. Deficit glukoze i nedostatak glukoplastičnih tvari u hrani potenciraju korištenje aminokiselina iz tjelesnih proteina, kao krajnje energetske rezerve organizma. Mobilizacija masnih kiselina i njihovo povećanje u krvi nastaju zbog supresije lipogeneze u masnom tkivu i stimulacijom lipolize. Već tijekom visoke gravidnosti dolazi do smanjenja intenziteta lipogeneze i esterifikacije masnih kiselina, da bi se taj proces početkom laktacije potencirao. Tijekom perioda laktacije (naročito rane) mlijecna žlijezda svoje potrebe za glukozom bazira na glukoneogenizi u jetri i smanjenju periferne potrošnje glukoze. Za potrebe mlijecne žlijezde iskoristiva je samo glukoza stvorena u jetri, jer ona može difundirati u krv i biti preuzeta od strane mlijecne žlijezde.

NEB koji postoji kod krava tijekom rane laktacije, trebalo bi ublažiti endogenom sintezom glukoze (iz rezervi), za što je presudna adaptacija endokrinog sustava. Tijekom ranog postpartalnog perioda, pojavljuje se NEB kao posljedica nesklada između rastućih potreba za energijom i smanjenog unosa energije hranom. Do tog dolazi zbog pada apetita i smanjene resorptivne sposobnosti buraga (Filipović i sur., 2007.). S povećanjem potreba za energijom na početku laktacije intenziviraju se katabolički i anabolički procesi. U vimenu dominiraju anabolički, a u masnom tkivu katabolički, dok se u jetri istovremeno odvijaju i anabolički (glukoneogeneza, sinteza triglicerida i lipoproteina) i katabolički procesi (beta

oksidacija masnih kiselina). Organi koji najviše trpe ovo metaboličko opterećenje su prije svega jetra, mlijecna žljezda te probavni i reproduktivni organi. Krave kod kojih je NEB jače izražen češće obolijevaju od ketoze ili masne infiltracije jetre, ali i drugih poremećaja energetskog i mineralnog metabolizma. Proces adaptacije organizma na nastali NEB traje približno do 72. dana laktacije (10-11 tjedana) (Folnožić i sur., 2015.).

Etiologija masne jetre

Proces prilagođavanja životinja na NEB počinje još tijekom perioda suhostaja kada se može ustanoviti početak procesa mobilizacije masti i promjene u hormonalnoj regulaciji, ali se životinje još nalaze u stanju pozitivnog energetskog statusa. Budući da je glikemija u tom periodu još uvijek visoka, metabolička ravnoteža se održava stabilnom. Kod nekih grla u ovom periodu nastaje zamašćenje jetre, što ukazuje da se prilagodbeni mehanizmi odvijaju u neželjenom pravcu. U ranom puerperiju ove su životinje podložnije nastanku poremećaja metabolizma. Vjerljativ razlog za ovu pojavu je hipotireoidizam, koji tada predstavlja uzrok NEB-a, da bi kasnije, kada otpočne laktacija, bio njegova posljedica.

Intenzitet i vrijeme započinjanja mobilizacije masti je individualno obilježje svake jedinke, a ovisi o količini masti u masnim rezervama. Mobilizacija masti u peripartalnom periodu predstavlja fiziološki mehanizam prilagodbe na povećane potrebe za energijom i promjene hormonske regulacije u vezi s porođajem i laktacijom. Međutim, kod nekih životinja, s početkom laktacije ovaj prilagodbeni mehanizam gubi to svojstvo i prelazi u patološko stanje. Razlog tome je poremećaj u radu regulacijskih mehanizama, koji više ne mogu osigurati usklađenost između intenziteta metaboličkih procesa i povećanih potreba

za energijom koje su nužne mlijecnoj žljezdi (Samanc i sur., 2005.).

Mehanizam koji osigurava kontrolu intenziteta mobilizacije masti i njegovo usklađivanje s energetskim zahtjevima organizma još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali je ustanovljeno da se kod zdravih krava na početku laktacije, bez obzira na povećane potrebe u energiji, koncentracija SMK-a nalazi unutar fizioloških granica, što kod ketoznih krava nije slučaj. Kod njih proces mobilizacije masti već prepartalno prelazi kritičnu točku, dodatno se intenzivira na početku laktacije i postaje jedan od najvažnijih uzroka poremećaja funkcije jetre i nastanka ketoznog stanja (Kovačević i sur., 2005.).

Masne kiseline mobilizirane iz masnog tkiva dospijevaju u krv, a iz nje u jetru te je koncentracija SMK u krvi i tkivu jetre direktno proporcionalna količini koja se mobilizira iz masnog tkiva. Ustanovljeno je da se koncentracija SMK-a u krvi visokosteonih krava udvostručuje u periodu od 17. do 2. dana pred teljenje, da bi se nakon teljenja učetvorostručila u odnosu na fiziološke vrijednosti (Grummer, 1993.).

Jetra je glavno mjesto obrade mobiliziranih SMK, a njihov prelazak iz krvi u tkivo jetre ovisi o njihovoj koncentraciji u krvi i brzine protoka krvi kroz jetru (Bell, 1995.). Kod krava u laktaciji je protok krvi kroz jetru brži u odnosu na zasušene krave, što doprinosi bržem i većem priljevu SMK u jetru (Emery i sur., 1992.). Budući da je povećan priljev SMK povećava se i sinteza triglicerida u jetri. Porast koncentracije SMK u krvi, koje počinje tijekom kasnog suhostaja i nastavlja se nakon teljenja je ključni čimbenik u zamašćenju jetre visokomlijecnih krava. Tijekom postpartalnog perioda dolazi do intenziviranja procesa sinteze i zadržavanja triglicerida u jetri ponajprije zbog smanjenog kapaciteta za sintezu i sekreciju lipoproteina veoma male

gustoće (VLDL) u krv. Posljedično dolazi do nakupljanja lipida u hepatocitima i nastanka masne jetre, povećanog stvaranja ketonskih spojeva i smanjenja koncentracije ukupnih lipida, kolesterola i triglicerida u krv (Vasquez-Anon i sur., 1991., Strang i sur., 1998.).

Negativna korelacija između koncentracije triglicerida u krvi i parenhimu jetre kod ketozih krava počiva na poremećenoj funkciji jetre, koja nije u mogućnosti sintetizirane triglyceride u potpunosti odstraniti putem VLDL-a. Stvoreni trigliceridi stoga ostaju u jetri te njihova koncentracija u krvi pada. Ako je eliminacija triglicerida iz hepatocita usporena ili se poveća dotok SMK-a dolazi do nakupljanja triglicerida u jetri, što se označava kao masna promjena. U slučaju da nakupljanje masti ne dovodi do narušavanja integriteta hepatocita, govori se o masnoj infiltraciji, a u suprotnom o masnoj degeneraciji jetre. Jednim imenom, ova pojавa se naziva masna jetra (hepatička lipidoza). Stupanj zamašćenja jetre može varirati od sasvim blagog do veoma teških oblika, kada dolazi do narušavanja morfološkog i funkcionalnog integriteta hepatocita i posljedičnih poremećaja zdravstvenog stanja. Raspored i količina masnih kapljica kod različitih stupnja zamašćenja se razlikuju, što je u skladu i s postupnim nastankom težih oblika zamašćenja (Šamanc i sur., 2005.). Količina masti u jetri u prvih 10 dana laktacije iznosi 60 do 125 g po danu. Zbog nakupljanja masti jetra poprima žučkastu boju i mikroskopskom pretragom spužvasti izgled. Prema stupnju, masna infiltracija jetre se može podijeliti na: normalno ili blago zamašćenu (0–20% lipida), srednje zamašćenu (20–40% lipida) i jako zamašćenu jetru (s više od 40% lipida) (Beitz, 2014.). Zbog nakupljanja masti u hepatocitima narušena je njihova funkcionalna aktivnost pa je kapacitet za glukoneogenezu smanjen, a to za posljedicu ima hipoglikemiju. Potrebe za

glukozom na početku laktacije (posebice kod krava koje daju preko 20 litara mlijeka dnevno) nadilaze kapacitet organizma za njenu sintezu, što se smatra jednim od vrlo važnih čimbenika u nastanku ketoze. Na hipoglikemiju je osjetljivo i masno tkivo, koje reagira povećanjem intenziteta mobilizacija masti. Intenzivna mobilizacija masti i zadržavanje masti u jetri dovodi do slabljenja procesa glukoneogeneze u hepatocitima, što za posljedicu ima poremećaj metabolizma koje obilježava hipoglikemija, hiperketonemija i ketonurija. Iako mobilizacija masti počinje prije teljenja, najintenzivnija je u prva dva tjedna laktacije kada dolazi do naglog porasta dnevne količine mlijeka. U tom razdoblju dolazi do povećanja koncentracije ukupnih lipida, koja najvećim dijelom počiva na rastu koncentracije slobodnih masnih kiselina, dok koncentracije kolesterola, triglicerida i drugih frakcija lipida ostaju nepromijenjene ili se smanjuju (Đoković i sur., 2005.).

Proces mobilizacije masti koji je za počet u suhostaju, a intenziviran nakon teljenja, predstavlja fiziološki mehanizam kojim se organizam pokušava prilagoditi na NEB. Zamašćenje jetre povezano je s nastankom niza poremećaja zdravlja, naročito onih metaboličke prirode (Grummer, 1993.). Nakupljanje masnog tkiva prouzroči upalu jetre te pojavu ožiljaka i otvrđnuća jetre te posljedičnim uginućem životinje. Zbog masne infiltracije jetre dolazi do degeneracije membrane hepatocita što vodi do egzocitoze enzima pohranjenih u citoplazmi te povećanju njihove aktivnosti u krvi (Đoković i sur., 2012.). Glavni pokazatelji jetrenih lezija i poremećaja u njezinoj funkciji su enzimi aspartat-aminotransferaza (AST), gama-glutamiltransferaza (GGT), glutamat-dehidrogenaza (GLDH) te koncentracija glukoze, kolesterola i albumina. Damjanović i sur. (1993.) su kod ketozih krava ustvrdili znatno smanjenje koncen-

tracije svih lipoproteinskih frakcija, a posebice VLDL-a, koji imaju primarnu ulogu u transportu triglicerida iz jetre. Za sintezu VLDL-a u jetri neophodno je prisustvo apolipoproteina, od kojih se najvažnijim smatra apolipoprotein B-100 (Katohu, 2002.). Vjerovatni mehanizmi koji mogu prouzročiti smanjenje sinteze i sekrecije VLDL-a kod krava su: smanjeni transport VLDL-a od endoplazmatskog retikuluma do Golgijevog aparata, otežana glikozilacija apolipoproteina B-100, smanjeno formiranje sekrecijskih vezikula i otežana migracija sekrecijskih vezikula iz Golgijevog aparata do stanične membrane. Za sintezu lipoproteina potrebni su inozitol, metionin, kolin i karnitin, a njihov se nedostatak smatra dodatnim čimbenikom u etiologiji nastanka masne jetre. Jetra je glavno mjesto sinteze kolesterola te se njegova koncentracija u krvi kod krava s oštećenom jetrom smanjuje (Gerloff i sur., 1986., Gaal, 1993.).

Uloga endokrinih mehanizama u nastanku masne jetre

Metabolički procesi razlaganja masti i sinteze triglicerida u hepatocitima nalaze se pod kontrolom endokrinog sustava hormona inzulina i glukagona. Ostali hormoni koji su prisutni u regulaciji mobilizacije masti i iskoristavanja masti u hepatocitima su somatotropni hormon (STH), inzulinu sličan čimbenik rasta I (IGF-I), tireoidni hormoni i leptin. Inzulin snižava glikemiju i omogućuje ulazak glukoze u stanice i njezino korištenje za energetske potrebe, dok u masnom tkivu djeluje anabolički, potičući lipogenezu u jetri i masnom tkivu te na taj način smanjuje koncentraciju slobodnih masnih kiselina u krvi te inhibira glukoneogenezu. Glukagon ima suprotne učinke, jer potiče lipolizu i ketogenezu, glukoneogenezu i glikogenolizu,

čime dovodi do povećanja glikemije i koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi. U peripartalnom periodu dolazi do smanjenja bazalne razine inzulina, pri čemu nema značajnijih promjena u razini glukagona (Giesecke i sur., 1987., Holtenius, 1993.). Razina inzulina tijekom suhostaja je visoka, da bi između 10. i 5. dana pred teljenje počela opadati. Hipoinzulinemija koja se pojavljuje tijekom visoke gravidnosti i rane laktacije, ima za posljedicu intenziviranje lipolize i često nekontroliranu mobilizaciju masti (Giesecke i sur., 1987.). Inzulinemija i koncentracija SMK-a u krvi se nalaze u negativnoj korelaciji te se u uvjetima hipoinzulinemije u peripartalnom periodu koncentracija SMK-a naglo povećava, što je posebno izraženo u prvim danima laktacije. U peripartalnom periodu povećava se rezistencija perifernih tkiva na inzulin, što smanjuje periferno iskoristavanje glukoze (Petterson i sur., 1994.). Zbog smanjene osjetljivosti perifernih tkiva prema inzulinu dolazi do skoro potpunog prestanka lipogeneze u masnom tkivu goveda (McNamara i Hillers, 1986.).

Rezistencija masnog i mišićnog tkiva prema inzulinu koja je prisutna 2-4 tjedna nakon teljenja dovodi do intenziviranja mobilizacije masti i aminokiselina te na taj način štedi glukuzu potrebnu za sintezu lakoze u mlječnoj žlijezdi (Dahl i sur., 2000.). U masnom tkivu je dominantan proces lipolize, a u jetri glukoneogeneza i lipogeneza. Izostanak lipogenog djelovanja inzulina na masno tkivo dovodi do pojave dominacije lipolitičkih hormona (glukagon) i jačanja procesa mobilizacije masti.

Povećana razina STH tijekom peripartalnog perioda i sniženje inzulinemije smanjuju stupanj lipogeneze u masnom tkivu i time usporavaju djelovanje ključnih enzima koji upravljaju ovim procesima kao što je sprječavanje djelovanja inzulina na aktivnost enzima acetil-koenzim A-karboksilaze (Bauman

i Vernon, 1993.). Hormon rasta u jetri stimulira sintezu IGF-I, što predstavlja temeljni mehanizam aktivacije STH - IGF-I (Jones i Clemons, 1995.). Sa smanjenjem osjetljivosti perifernih tkiva na djelovanje STH zbog postojanja NEB-a, na početku laktacije dolazi do smanjenja koncentracije IGF-I (Redcliff i sur., 2003.). Smanjenje razine IGF-I prati smanjenje razine inzulina koje započinje oko 2 tjedna prije teljenja, a za to vrijeme dolazi do porasta razine STH (Bell, 1995.). Prema Butler i sur. (2003.) glavni regulator sekrecije IGF-I u jetri je inzulin.

Leptin je tkivni hormon proteinske građe, kojeg stvaraju adipociti (Spicer, 2001.). Koncentracija leptina u krvnoj plazmi nakon obroka nalazi se u pozitivnoj korelaciji s glikemijom, a u negativnoj s koncentracijom BHB-a. Visoka koncentracija leptina utječe preko središnjeg živčanog sustava na smanjenje unosa hrane. Tijekom gladovanja razina leptina se smanjuje, što ima odgovarajuće učinke na metabolizam, reprodukciju i imunosni odgovor (Lord i sur., 1998.). Niska koncentracija leptina u postpartalnom periodu u vezi je i s hipoinzulinemijom, jer inzulin povećava ekspresiju mRNA za sintezu peptidnih lanaca leptina (Saladin i sur., 1995.). Nastanak hipoleptinemije potencira i visoka koncentracija STH koji preko niske koncentracije IGF-I i hipoinzulinemije smanjuje izlučivanje leptina. Sniženje koncentracije leptina do kojeg dolazi u postpartalnom periodu može djelomično pospješiti apetit, koji je u to vrijeme smanjen (Chillard i sur., 2001.). Istraživanja koja su proveli Oldenbroek i sur. (1989.) ukazuju na pozitivnu korelaciju između koncentracije hormona štitnjače u krvi i energetskog statusa i negativnu korelaciju između njihove koncentracije i mlijecnosti. Utvrđeno je da su koncentracije T_3 i T_4 u uvjetima NEB-a i intenzivne mobilizacije masti znatno niže od fizioloških vrijednosti. U periodu oko teljenja naročito je izražen

pad T_3 (Blum i sur., 1983., Kunz i sur., 1985., Furll i sur., 1993.).

Klinička slika

Za sindrom masne jetre u goveda nema patognomoničnih kliničkih znakova. Često se ovo stanje povezuje sa smanjenim unosom hrane, smanjenom mlijecnosti i ketozom. Povećana koncentracija SMK potiče lipogenezu i ketogenezu u hepatocitima. Zbog povećane koncentracije SMK u krvi oslabljen je imunosni odgovor i protuupalni učinak, što za posljedicu ima veću incidenciju kliničkih mastitisa, metritisisa i drugih peripartalnih zaražnih bolesti. Akumulacija lipida u jetri utječe i na imunosni odgovor, na što ukazuje smanjen klirens endotoksina i povećanje koncentracije proteina akutne faze upale, haptoglobina i serumskog amiloida A sintetiziranih u jetri (Bobe, 2004.). Visoke koncentracije BHB-a i acetooacetata usporavaju β -oksidaciju, glukoneogenezu i ciklus limunske kiseline u hepatocitima. Metaboličke posljedice nakupljanja triglicerida u jetri uključuju smanjenje glukoneogeneze, ureogeneze i klirensa hormona. Zbog toga hipoglikemija, hiperamonijemija i poremećaj endokrinog sustava mogu pratiti sindrom masne jetre. Masna jetra se vjerojatno razvija istovremeno s drugim bolestima i poremećajima koji nastaju tijekom ili nakon teljenja. To uključuje upalu maternice, mastitis, dislokaciju sirišta ili porođajnu hipokalcemiju. Odgovor na liječenje je loš, osobito ako krave imaju opsežne masne infiltracije jetre. Tijekom tog razdoblja kravama je smanjen apetit, postaju slabije, leže, a nakon toga za 7–10 dana ugibaju. Mogu se uočiti i živčani simptomi poput držanja glave u visokoj poziciji s mišićnim treomorom vratnih mišića i mišića glave, a na kraju se javlja takardija i koma.

U krava sa sindromom masne jetre javljaju se reproduktivni poremećaji,

jer razvoj folikula počinje u ranom poslijeporođajnom razdoblju (Breukink i Wensing, 1997.). Usporena involucija maternice može se objasniti učestalom i dugotrajnim endometritisima, koji mogu biti prouzročeni zakašnjeljim i smanjenim imunosnim odgovorom u endometriju (Zerbe i sur., 2000.). Odgođena ciklička aktivnost jajnika može se objasniti djelomice smanjenom i odgođenom sintezom steroidnih hormona, progesterona i luteinizirajućeg hormona (Zhou i sur., 1997.). Drugi razlog za odgođenu cikličku aktivnost jajnika jest stanje NEB-a. Smanjenje koncentracije IGF-I, inzulina i lipoproteina i povećanje koncentracije amonijaka, SMK i ureje može narušiti normalnu funkciju jajnika (Comin i sur., 2002., Jorritsma i sur., 2003.). Povećana razina SMK tijekom NEB-a zajedno sa sniženom koncentracijom glukoze i inzulina odgadaju početak pulzatornog izlučivanja gonadotropina, LH i FSH koji su neophodni za stimulaciju folikulogeneze. Smanjenjem razine inzulina i posljedično tome smanjenjem produkcije IGF-I u jetri se može objasniti refrakternost jajnika prema gonadotropinima. Smanjeno izlučivanje progesterona nakon teljenja usporava involuciju maternice i cikličnu aktivnost jajnika (Gereš i sur., 2009.). Smanjeni postotak koncepcije u krava sa sindromom masne jetre posljedica je smanjenja broja zametaka koji prezive tijekom ranog embrionalnog razvoja (Wensing i sur., 1997.).

Dijagnoza

Sindrom masne jetre obično se dijagnosticira nakon što je životinja prestala jesti, ili je uginula zbog neke druge bolesti. Biopsija jetre je minimalno invazivna i pouzdana metoda za određivanje stupnja zamašćenja jetre u mlječnih krava. Određivanje ukupnih lipida i triglicerida pomoću gravimetrijske i kemijske metode nakon

ekstrakcije iz tkiva je potrebno za kvantitativne procjene, ali takvi se testovi ne provode rutinski u komercijalnim laboratorijima. Metaboliti iz krvi i urina te aktivnosti enzima u krvi predstavljaju neizravne dijagnostičke pokazatelje. Koncentracija glukoze u krvi je niska, a koncentracije SMK i BHB-a su visoke u uvjetima koji pogoduju razvoju masne jetre. Koncentracija kolesterola u krvi obično je kod masne jetre niska, što može smanjiti sposobnost jetre u izlučivanju lipoproteina. Aspartat aminotransferaza (AST), ornitin dekarboksilaza i sorbitol dehidrogenaza su jetreni enzimi koji se mogu dovesti u vezu s oštećenjem jetre. Ukupna koncentracija bilirubina u krvi često je povezana s povišenom koncentracijom SMK-a u krvi. Krvni metaboliti ili enzimi nisu pouzdani pokazatelji za određivanje stupnja zamašćenja jetre, jer koncentracije variraju između jedinki iste vrste, pasmine i kategorije.

Sažetak

Najkritičnije razdoblje za metabolizam visokomlijekočnih krava je prijelaz iz suhostaja u fazu rane laktacije. Krave tijekom visoke gravidnosti unose veću količinu energije od one koja je stvarno potrebna njihovom organizmu pa se zbog toga višak energije skladišti. Prva faza laktacije najkritičnija je faza u proizvodnom ciklusu mlječnih krava, jer je organizam opterećen do krajnjih fizioloških granica. U ovoj fazi razvija se negativni energetski status (NEB). U prvoj trećini laktacije krave, zbog NEB-a i pojačane mobilizacije masti, gube u tjelesnoj kondiciji, a mogu i oboljeti. Do uspostave pozitivnog energetskog statusa dolazi 8–10 tjedna nakon teljenja. U međuvremenu organizam mobilizacijom masti nastoji umanjiti energetsку neravnotežu. Međutim, to predstavlja veliku mogućnost za narušavanje metaboličke ravnoteže i posljedično nastanak masne jetre.

Ključne riječi: *gravidnost, laktacija, negativni energetski status, mobilizacija masti, masna jetra*

Zahvala

Ovaj je rad financijski potpomognut od Hrvatske zaklade za znanost, Zagreb; Hrvatska (projekt br. IP-2014-09-6601, ModZeCow). Glavni istraživač projekta je dr. sc. Marko Samardžija, redoviti profesor Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska.

Literatura

1. ACORDA, J. A., H. YAMADA and S. M. GHAMSARI (1995): Comparative evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy cattle by using blood and serum analysis, ultrasonography, and digital analysis. *Vet. Q.* 17, 12-14.
2. BAUMAN, D. E. and R. G. VERNON (1993): Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Ann. Rev. Nutr.* 13, 437-461.
3. BEITZ, D. (2014): Etiology and prevention of Fatty Liver and Ketosis in Dairy Cattle. Florida Ruminant Nutrition 24th Symposium, 41-52.
4. BELL, A. W. (1995): regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73, 2804-2819.
5. BLUM, J. W., P. KUNZ, H. LEUNBERGER, K. GAUTSCHI and N. KELLER (1983): Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in Dairy cows. *Anim. Prod.* 36, 93-104.
6. BOBE, G., J. W. YOUNG and D. C. BEITY (2004): Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3105-3124.
7. BREUKINK, H. J. and T. WENSING (1997): Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production. *Isr. J. Vet. Med.* 52, 66-72.
8. BUTLER, W. R. (2003): Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Prod. Sci.* 83, 211-218.
9. BUTLER, W. R. (2012): The role of energy balance and metabolism on reproduction of dairy cows. <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2012/7ButlerRNS2012a.pdf>.
10. CHILLARD, Y., M. BONNET, C. DELAVAUD Y. FAULCONNIER, C. LEROUX, J. DIJANE and F. BOCQUIER (2001): Leptin in ruminants. gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Dom. Anim. Endocrinol.* 21, 271-295.
11. COMIN, A., D. GERIN, A. CAPPA, V. MARCHI, R. RENAVILLE, M. MOTTA, U. FAZZINI and A. PRANDI (2002): The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology* 58, 899-910.
12. DAHL, G. E., B. A. BUCHANAN and H. A. TUCKER (2000): Photoperiodic effects of dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 83, 885-893.
13. DAMJANOVIĆ, Z., H. ŠAMANC, M. JOVANOVIĆ i S. MARKOVIĆ (1993): Koncentracija lipida i lipoproteina u krvnom serumu zdravih i ketoznih krava. *Vet. glasnik* 47, 335-342.
14. EMERY, R., J. LIESMAN and T. HERDT (1992): Metabolism of long chain fatty acid by ruminant liver. *J. Nutr.* 122, 832-837.
15. FILIPOVIĆ, N., Z. STOJEVIĆ and L. BAČAR-HUSKIĆ (2007): Energetski metabolizam u krava tijekom razdoblja rane laktacije. <https://bib.irb.hr/datoteka/304397.praxis-n.filipovic-55-1-2.pdf> On line 10.9.2015.
16. FOLNOŽIĆ, I., R. TURK, D. ĐURIĆIĆ, S. VINCE, J. PLEADIN, Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ, H. VALPOTIĆ, T. DOBRANIĆ, D. GRAĆNER and M. SAMARDŽIJA (2015): Influence of Body Condition on Serum Metabolic Indicators of Lipid Mobilization and Oxidative Stress in Dairy Cows During the Transition Period. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 910-917.
17. GAAL, T. (1993): Sindrom masne jetre u mlečnih krava. *Vet. glasnik* 47, 311-317.
18. GEREŠ, D., R. TURK, D. ŽUBČIĆ, B. VULIĆ, N. STAKLAREVIĆ and B. ŽEVRNJA (2009): Influence of nutrition into the postparturient period on the fertility of dairy cows. *Vet. arhiv* 79, 119-130.
19. GERLOFF, B., T. HERDT and R. EMERY (1986): Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *JAVMA*, 188, 845-849.
20. GIESECKE, D., H. MEYER and G. LOIBL (1987): Fortschritte d. Tierphysiologie u. Tierernährung N 18, 43-56.
21. GOFF, J. P. and R. L. HORST (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.
22. GRUFFAT, D., D. DURAND, B. GRAULET and D. BAUCHART (1996): Regulation of VLDL synthesis and secretion of the liver. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 375-389.
23. GRUMMER, R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
24. JONES, J. I. and D. R. CLEMMONS (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev.* 16, 13-34.
25. JORRITSMA, R., T. WENSING, T. A. M. KRUIP, P. L. A. M. VOS, and J. P. T. M. NOORDHUIZEN (2003): Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34, 11-26.
26. KATOH, N. (2002): Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 293-307.
27. KOVACIĆ, M., H. ŠAMANC, J. A. NIKOLIĆ, D. BUGARSKI, M. JOVIĆIN i S. KOŠARCIĆ (2005): Hormonalni status i uhranjenost mlečnih krava u peripartalnom periodu, Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, str. 139-146.
28. KUNZ, P. L., J. W. BLUM, I. C. W. HART, H. BICKET and J. LANDIS (1985): Effects of different energy intakes before and after calving on food intake performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Anim. Prod.* 40, 219-231.

29. LORD, G. M., G. MATARESE, J. K. HOWARD, R. J. BAKER, S. R. BLOOM and R. I. LECHER (1998): Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-900.
30. McNAMARA, J. P. and J. K. HILLERS (1986): Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *J. Lipid Res.* 27, 150.
31. OLDENBROEK, J. K., G. J. GARSEN, A. B. FORBES and L. J. JONKER (1989): The effect of treatment of dairy cows of different breeds with recombinantly derived bovine somatotropin in a sustained delivery vehicle. *Livest. Prod. Sci.* 21, 13-24.
32. PETTERSON, J. A., R. SLEPETIS, R. A. EHRHARDT, F. R. DUNSHEA and A. W. BELL (1994): Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression on fat mobilization in sheep. *J. Nutr.* 124, 2431.
33. REDCLIFF, R. P., B. L. McCORMACK, B. A. CROOKER and M. C. LUCY (2003): Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3920-3926.
34. REID, I. M. (1980): Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet. Rec.* 107, 281-284.
35. SALADIN, R., P. DE VOS, M. GUERRE-MILLO, A. LETURQUE, J. GIRARD, B. STAELS and J. AUWERX (1995): Transient increase in obse gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377, 527-529.
36. SAVIĆ, Đ. (2010): Etiopatogeneza zamašenja jetre visokomlijecihi krava.. <http://veterina.info/goveda/25-goveda/bolesti-goveda/1151-etiopatogeneza-zamasene-jetre-visokomlječnih-krava.2.9.2015>.
37. SPICER, L. J. (2001): Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Dom. Anim. Endocrinol.* 21, 251-270.
38. STRANG, B. D., S. J. BERTICS, R. R. GRUMMER and L. E. ALMENTANO (1989): Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 81, 728-739.
39. ŠAMANC, H., Z. SINOVEC i H. CERNESCU (2005): Osnovi poremećaja prometa energije visokomlečnih krava, Zbornik radova 4. simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda – Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda, Subotica, str. 89-101.
40. VASQUEZ-ANON, M., S. BERTICS, M. LUCK and R. GRUMMER (1991): Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74, 4238-4253.
41. WENSING, T., T. KRUIP, M. J. H. GEELEN, G. H. WENTINK and A. M. VAN DEN TOP (1997): Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comp. Haematol. Int.* 7, 167-171.
42. ZERBE, H., N. SCHNEIDER, W. LEIBOLD, T. WENSING, T. A. M. KRUIP and H. J. SCHUBERTH (2000): Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54, 771-786.
43. ZHOU, J., J. ZHANG, W. TIAN and C. ZHENG (1997): Study of the effect of fatty liver on fertility in periparturient cows *Acta Vet. Zootechn. Sin.* 28, 115-119. (In Chinese; abstract in English).

Mechanism of Fatty Liver Development During the Transition Period in Dairy Cows

Roland PEŠA, DVM, Romana TURK, Mag. Biochem., PhD, Assistant Professor, Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Damjan GRAČNER, DVM, PhD, Full Professor, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Ivan BUTKOVIĆ, DVM, Assistant, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Veterinary Practice Đurđevac, Croatia; Mislav KOVAČIĆ, DVM, PhD, Mount-Trade, Garešnica, Croatia

The most critical period for metabolism of highly lactating dairy cows is the transition from the dry period into the early stage of lactation. During pregnancy, cows have a higher energy input than actually needed for the body and therefore, the excess energy is stored. The first phase of lactation is the most critical period in the production cycle of dairy cows, as the organism is loaded to the extreme physiological limits. In this phase, an NEB is developed. In the first third of lactation, due

to the NEB and increased mobilization of fats, cows lose body condition and are more susceptible to disease. A positive energy status is established at 8-10 weeks after calving. Meanwhile, the organism tries to reduce the energy imbalance through the mobilisation of fats. However, disruption of the metabolic balance is possible, leading to the development of fatty liver.

Key words: *Pregnancy, Lactation, Negative energy status, Fat mobilization, Fatty liver*

Parenhimatozni poremećaji jetre u pasa i mačaka - (I. dio)

Kristina Lučić i Dalibor Potočnjak*



Uvod

Jetra je drugi najveći organ u organizmu i obavlja oko 1500 esencijalnih biokemijskih reakcija u organizmu. Te reakcije podrazumijevaju niz metaboličkih, detoksikacijskih i konjugacijskih procesa koji potpomažu održanje homeostaze organizma. Ona ima važnu ulogu u metabolizmu masti, ugljikohidrata te najvažnije proteina. Uz to, u jetri se stvara dio faktora zgrušavanja krvi, pohranjuje se željezo, različiti vitamini, a predstavlja i veliki spremnik krvi. S obzirom na širok aspekt djelovanja jetre, jasno je da prilikom oboljenja ovoga organa moramo učiniti detaljnu i opsežnu kliničko/dijagnostičku evaluaciju pacijenta posebice kako ne bi došlo do komplikacija jetrenih bolesti koje mogu biti i fatalne ako nisu prepoznate.

Bolesti jetrenog parenhima predstavljaju relativno česte bolesti pasa i mačaka. Ipak, često ove bolesti mogu promaknuti kliničaru upravo zbog nespecifične simptomatologije, a uz to se često događa da se bolesti jetre javljaju sekundarno nakon oštećenja drugih organskih sustava, recimo u slučaju hepatičke lipidoze kod *diabetesa mellitus*, steroidima inducirane hepatopatije kod

Cushingovog sindroma, reaktivnog hepatitisa u bolestima probavnog trakta i centrolobularne nekroze u slučaju akutne izrazite anemije. Zahvaljujući velikim jetrenim rezervama i mogućnošću regeneracije, simptomi se razvijaju u kasnim stadijima bolesti. Upravo zbog toga je sama dijagnostika ponekad vrlo iscrpna i složena, a osobito u slučaju parenhimatoznih oboljenja kada nam je za dijagnostiku korisnija ultrazvučna nego rentgenološka pretraga. Nerijetko konačnu dijagnozu možemo utvrditi samo patohistološkom pretragom.

Svrha ovog rada je dati prikaz dviju najznačajnijih bolesti jetrenog parenhima, akutnog hepatitisa i akutne hepatičke nekroze te kroničnog hepatitisa.

Akutni hepatitis i akutna hepatička nekroza

Etiologija

Smrt hepatocita (nekroza i apoptoza) u pasa i mačaka javljaju se kao posljedica djelovanja različitih inzulta među kojima su infekciozni agensi, lijekovi, toksini, hipoksija, imunosni i metabolički poremećaji. Hepatička nekroza i akutna

Kristina LUČIĆ, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Dalibor POTOČNJAK*, dr. med. vet., redoviti profesor (dopisni autor, e-mail: dpotocnjak@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

upala često se javljaju istovremeno, a sami odnosi između ova dva procesa su poprilično kompleksni. Akutna upala može biti primarni čimbenik ili može slijediti nakon snažnog upalnog odgovora, odnosno opsežne nekrotične smrti stanica (Rutherford i Chung, 2008.).

Pojam "akutni hepatitis" obično se koristi kada infekcioni agensi prouzroče hepatocelularnu nekrozu, iako u ranim stadijima hepatička nekroza može biti minimalna ili čak odsutna (Van den Ingh i sur., 2006.).

Akutni hepatitis i nekroza su česta morfološka obolenja jetre koja se u pasa i mačaka očituju kao akutna bolest prouzročena infekcijom, toksinima, metaboličkim inzultima i ishemičkim poremećajima. No, akutna bolest jetre može biti povezana s drugim patološkim procesima poput teške hepatičke lipidoze (mačke), granulomatoznog hepatitisa (gljivična infekcija), intrahepatičke kolestaze (bakterijski kolangitis, leptospiroza) i malignih promjena (limfom, maligni histiocitom). Pseći adenovirus I, pseći i mačji herpesvirus u novorođenčadi, *Clostridium piliforme* i *Toxoplasma gondii* su konkretni primjeri infektivnih agenasa koji prouzroče hepatičku nekrozu (s upalom), što je često u sklopu multisistemskog poremećaja (Van den Ingh i sur., 2006.). Iako je leptospiroza lako prepoznatljiva infekcija koja prouzroči akutnu bolest jetre u pasa, hepatička nekroza nije česta, a hepatičke lezije su histološki tipično karakterizirane kolestazom, odvajanjem hepatocita i nespecifičnim reaktivnim hepatitisom (Hartman i sur., 1986.).

Usprkos velikom broju potencijalnih uzroka akutnog hepatitisa i nekroze, specifični uzrok često ostaje neutvrđen (Poldervaart i sur., 2009.).

Patofiziologija

Unatoč velikom broju uzroka koji dovode do smrti hepatocita, dva su glavna mehanizma nastanka: apoptoza i nekroza (Van den Ingh i sur., 2006.). Ova

dva mehanizma prije su bili smatrani kao dva zasebna procesa, no danas se pak smatra da su nekroza i apoptoza dodatne posljedice istog inicijalnog uzroka i signalnih puteva (Rutherford i Chung, 2008.). Apoptoza je programirana smrt stanice ovisna od adenozin-3-fosfatu (ATP) koja prouzroči skvrčenje stanice (apoptotička ili acidofilna tjelešca) s kontinuiranom resorpcijom sadržaja stanice, minimalnim istjecanjem celularnih komponenti i minimalnom sekundarnom upalom. Nekroza se pojavljuje kada dođe do potrošnje zaliha ATP-a koje rezultira oticanjem stanice, gubitkom integriteta stanične membrane i staničnom lizom s otpuštanjem sadržaja stanice i sekundarnom upalom (Van den Ingh i sur., 2006., Rutherford i Chung, 2008.).

Difuzni hepatitis je najdosljednija histološka lezija utvrđena u pasa i mačaka s akutnim zatajenjem jetre. Akutno zatajenje jetre (ALF, engl. *Acute Liver Failure*) je rijetki klinički sindrom (često fatalni) koji se javlja kada iznenadni žestoki inzult na jetru kompromitira 70% funkcionalne jetrene mase. Smrt stanica jetre nadvlada regenerativne kapacitete jetre te rezultira kliničkim znacima zatajenja jetre (Cooper i Webster, 2006.). Klinička i laboratorijska obilježja ALF-a su nespecifična što se tiče uzroka koji je doveo do toga, ali reflektira poremećaj jedne ili više jetrenih funkcija. Kada se jednom pojavi hepatocelularno oštećenje (pod pretpostavkom da pacijent preživi), morfološke promjene koje se događaju u jetri posljedično odgovoru na inzult mogu uključivati parenhimatoznu regeneraciju, fibrozu i duktalnu proliferaciju. Gotovo potpuna regeneracija jetre je moguća ako je ozljeda hepatocita ograničena i mreža retikulinskih vlakana ostane intaktna. S jakom destrukcijom parenhima ili velikim gubitkom hepatocita, najvjerojatnije će doći do periportalne duktalne proliferacije, hepatičke

fibroze, postnekrotične skarifikacije i regenerativnih hepatičkih nodula (Van den Ingh i sur., 2006.). Isto tako, može doći do progresije akutnog u kronični hepatitis u pasa (Poldervaart i sur., 2009.).

Klinička slika

Kliničko očitovanje akutnog hepatitisa i nekroze kod pasa i mačaka varira u odnosu na glavni uzrok i proširenost, odnosno jačinu lezija na jetri. Spektar simptoma uključuje:

1. supklinički tijek bolesti (jedino biokemijski vidljiv poremećaj)
2. kliničke znakove akutne bolesti jetre ili
3. klinički sindrom ALF-a.

Kada je jetreno oštećenje blago (fokalna nekroza i upala), klinički znaci mogu biti odsutni, blagi ili povezani s osnovnim uzrokom u drugom organskom sustavu. U ovom slučaju, zahvaćenost jetre patološkim procesom može biti skrivena sve dok biokemijska pretraga krvi ne pokaže povišenu aktivnost jetrenih enzima ili blagu hiperbilirubinemiju. Mnogo pasa s akutnim hepatitism ne budu klinički prepoznati, jer su znaci blagi ili samolimitirajući te se oporave spontano bez obzira na terapiju (Favier, 2009.).

Klinički znaci akutnog hepatitisa su nagla pojava letargije, anoreksija, povraćanje, poliurijska/polidipsija (PU/PD) i proljev u prethodno potpuno zdrave životinje. Ovo su nespecifični simptomi akutne bolesti jetre, koji se preklapaju sa simptomima drugih sistemskih poremećaja. Pronalazak žutice prilikom kliničkog pregleda je mnogo specifičniji simptom hepatobilijarne bolesti, pogotovo uz odsutnost anemije (Washabau, 2013.).

Psi i mačke s akutnom difuznom hepatičkom nekrozom često dolaze s ALF-om. Uz znakove akutne bolesti jetre koji su prethodno opisani, životinje

s ALF-om pokazuju znakove hepatičke encefalopatije (depresija, promjene u ponašanju, demencija, ataksija, kruženje, sljepoča, hipersalivacija, napadaji i koma) i znakove tendencije krvarenju (melena, hematemiza ili kutane i sluzničke hemoragije), što nas upućuje na tešku disfunkciju jetre. Znakovi ALF-a su brzi i progresivni (od jednog sata pa do nekoliko dana) što čini ovaj sindrom često fatalnim, s mortalitetom koji varira od 25% do 100% (Cooper i Webster, 2006.).

U životinja s akutnim zatajenjem jetre tipično se simptomi pojave naglo i to u životinje koja je prethodno bila potpuno zdrava. Vlasniku treba postaviti pitanja kojima bismo otkrili bilo kakve suptilne znakove kronične bolesti, koji bi nam ukazivali na to da je glavni uzrok akutnog zatajenja zapravo kronična bolest, odnosno da je trenutna bolest rezultat egzacerbacija ili dekompenzacije kronične bolesti jetre. Psi i mačke s ALF-om su generalno dobrog gojnog stanja u usporedbi sa životinjama koje imaju kroničnu bolest jetre. Pronalazak kaheksije, mršavljenja, ascitesa ili edema upućuju na protrahiranu bolest i karakterističniji su za kroničnu nego za akutnu bolest jetre. Vrlo je važno napraviti razliku između kronične i akutne bolesti budući da intenzivna njega koja je potrebna životinjama s ALF-om može biti od slabe ili nikakve pomoći za životinje s kroničnom *end-stage* bolesti jetre (Poldervaart i sur., 2009.).

Dijagnoza

Inicijalni podatci u pasa i mačaka s akutnom bolesti jetre moraju sadržavati kompletnu krvnu sliku (KKS), biokemijsku pretragu krvi i analizu urina. Povišenje aktivnosti jetrenih enzima je čest nalaz u pasa i mačaka s akutnim hepatitism ili nekrozom. Kod blage ozljede jetre ili fokalne hepatičke nekroze, jedino odstupanje u biokemijskom profilu može biti

povećanje ALT-a u inače neupečatljivom biokemijskom profilu. Povišenje ALT-a i AST-a može biti blago do izrazito povišeno, ovisno o oštećenju hepatocita prilikom kojeg dolazi do izlaska enzima iz stanica. Iako je aktivnost ALT-a povišena kod svih jetrenih oboljenja, najveća magnituda porasta je uočena kod akutne hepatičke nekroze i u korelaciji je s brojem zahvaćenih stanica. Aktivnost ALT-a može biti povišena i do 100 puta s paralelnim porastom AST-a čije su vrijednosti niže (najviše do 30 puta iznad fizioloških vrijednosti). Enzimi koji su indikatori kolestaze (ALP i GGT) su isto tako povišeni, ali magnituda povišenja je znatno niža nego u slučaju ALT-a i AST-a (Center, 2007.).

Promjene u biokemijskom profilu poput hiperbilirubinemije, povišenih SBA, hipoglikemije i hiperamonijemije ukazuju na smanjenu funkciju jetre. Hiperbilirubinemija i bilirubinurija idu u prilog znatnijem oštećenju jetre prouzročeno prehepatičkim (hemolitičkim) uzrokom. Primarne smetnje u bilijarnom traktu koje uključuju posthepatičke mehanizme nastanka hiperbilirubinurije isto se tako moraju uvrstiti na popis diferencijalnih dijagnoza. Ostale mogućnosti za hipoglikemiju uz akutnu bolest jetre uključuju otrovanje ksilitolom (pojačano izlučivanje inzulina) i sepsu. Hipoalbuminemija obično upućuje na kroničnu prije nego akutnu bolest zbog dugog poluživota albumina. Ako je prisutna azotemija, dehidracija, gubitak krvi putem GI trakta, treba uzeti u obzir i popratno oštećenje bubrega (npr. kod leptospirose, nesteroidnih protuupalnih lijekova). Interpretacija azotemije je olakšana istodobnom interpretacijom analize urina. Ozljeda bubrega dokazuje se pronalaskom celularnih ili granuliranih odljeva, glukozurijom, izostenurijom i proteinurijom. Kompletna krvna slika može otkriti upalni odgovor što upućuje

na glavni infekcionalni ili upalni poremećaj te je također korisna za isključivanje hemolitičke anemije kao uzroka žutice. Za kliničku dijagnozu isto je tako potrebno provjeriti i koagulabilnost krvi; laboratorijski nalazi koji upućuju na koagulopatiju uključuju prolongirano PT i aPTT, smanjeni fibrinogen i povišene produkte raspada fibrina te trombocitopeniju (Washabau, 2013.).

Rentgenološka pretraga abdomena je često negativna u pasa i mačaka s akutnim hepatitisom i nekrozom. Jetra se može činiti normalne veličine ili može izgledati povećana. Ultrazvuk abdomena može prikazati normalnu ili hipoehogenu jetru. Ove nam pretrage mogu biti korisne u isključivanju drugih uzroka akutnog hepatitisisa i poremećaja bilijarnog trakta (Washabau, 2013.).

Budući da psi i mačke s akutnim hepatitisom i nekrozom očituju nespecifične znake akutnog zatajenja jetre, kliničar bi trebao imati široku perspektivu što se tiče mnogih potencijalnih bolesti i procesa koji mogu imati učinka i na jetru. Prije nego što se odlučimo za biopsiju jetre, treba provesti ostale pomoćne pretrage (citologija ili biopsija lako dostupnih lezija, titer tijela na infekcione bolesti ili molekularni tetsovi, RTG/UZV) kako bi se isključili sistemski ili multisistemski poremećaji koji sekundarno dovode do oštećenja jetre. Time bismo došli do dijagnoze drugih uzroka akutne bolesti jetre na manje invazivan način (Washabau, 2013.).

Kada postoji sumnja na akutni hepatitis ili hepatičku nekrozu (ili su potvrđene biopsijom), treba temeljito sagledati anamnezu pacijenta kako bismo uočili izloženost pacijenta potencijalnim hepatotoksinima i infekcionim agensima. Vlasnika treba upitati za nedavno davane lijekove, uključujući i one na recepte i *over-the-counter* lijekove te preparate alternativne medicine poput raznih biljnih i dijetalnih pripravaka.

Potrebno je ustvrditi i potencijalnu izloženost kemikalijama ili toksinima (aflatoksi). Ostali podaci koje moramo uzeti pri anamnezi su podaci o cijepljenju (pseći adenovirus, leptospiroza), eventualna putovanja (gljivične infekcije i bolesti prenosive krpeljima) te izloženost drugim životinjama (mogući uzrok infekcije) (Washabau, 2013.).

Biopsija jetre je neophodna u utvrđivanju akutnog hepatitisa i nekroze ako želimo ustvrditi specifičan uzrok i razlikovati akutnu od kronične bolesti. Biopsija se može odgoditi u pacijenata s blagim (ili odsutnim) kliničkim znacima i povišenom aktivnošću jetrenih enzima koji odgovaraju na aplikaciju lijekova. Isto se tako može prekinuti započeta terapija te se pratiti pojavnost kliničkih znakova i aktivnost jetrenih enzima kroz 2-3 tjedna. Za pacijenta s ALF-om i koagulopatijom, kliničar mora pažljivo odvagnuti važnost histološke pretrage u usporedbi s rizikom pretjeranog krvarenja tijekom izvođenja postupka (Washabau, 2013.). Na žalost, većina rutinskih biopsija jetre vjerojatno neće otkriti specifičan uzrok akutnog hepatitisa (Van den Ingh i sur., 2006.).

Terapija

Ako se može otkriti mogući uzrok akutnog hepatitisa i hepatičke nekroze, specifična terapija se usmjerava prema primarnom uzroku (npr. prekinuti potencijalno hepatotoksične lijekove, terapija leptospirose doksiciklinom ili keliranje hepatičkog bakra s penicilaminom). U većini je slučajeva specifična terapija nemoguća i liječenje je usmjereno prema generalnoj potpornoj i simptomatskoj terapiji. Glukokortikoidna terapija nije indicirana u liječenju akutnog hepatitisa (Poldervaart i sur., 2009.). Empirijsko liječenje s antioksidansima poput S-adenozilmetionina (SAMe); 20 mg/kg p.o. svaka 24 h, mlijekom čička (Siliphos; 3-6 mg/kg p.o. svaka 24 h), ili vitaminom E (10-15 IU/kg svaka 24 h) je

korisno, jer se vjeruje da oksidativni stres igra ulogu u oštećenjima jetre potaknute lijekovima (karprofen, potencirani sulfonamidi, diazepam, metimazol, lomustin i dr.) (Webster i Cooper, 2009.). SAMe i čičkovo mlijeko imaju dodatno citoprotektivno djelovanje koje može biti korisno u nekrotično-upalnim hepatopatijama i hepatotoksičnosti (Washabau, 2013.).

Aktivnost jetrenih enzima bi se trebala pratiti kako bi se ustvrdio uspjeh terapije. Ponavljanje biopsije jetre 6-8 tjedana nakon inicijalne dijagnoze je indicirano kako bi se potvrdilo da se akutni hepatitis poboljšao ili nestao, odnosno kako bi se potvrdilo prelazi li akutni hepatitis u kronični (Poldervaart i sur., 2009.). Smatra se da se većina pasa s blagim idiopatskim akutnim hepatitisom (bez ALF-a) oporavi nakon nekoliko dana usprkos terapiji (Favier, 2009.).

Za pacijente s ALF-om je neophodna agresivna potporna terapija. Ciljevi terapije su liječiti temeljni uzrok kada je moguće, omogućiti dovoljno vremena za regeneraciju i obnovu jetre i prevenirati ili kontrolirati komplikacije zatajenja jetre. Intravenozna aplikacija N-acetilcisteina (NAC), izvora glutationa/oksidansa je antidot izbora pri liječenu toksičnosti acetaminofena. NAC isto tako ima dodatne pozitivne učinke (poboljšava sistemsku cirkulaciju i dostavu kisika tkivima) te bi se također mogao aplicirati u pasa s ALF-om. Još nije potvrđen optimalni režim doziranja kada se NAC koristi za ovu svrhu (Cullen, 2009.).

Prognoza

Prognoza za pse s akutnim hepatitisom je dobra, budući da se veliki broj pasa oporavi u potpunosti. Međutim, postoji mogućnost da će psi s akutnim hepatitisom razviti kroničnu bolest (Poldervaart i sur., 2009.). Ako životinja pokazuje znakove uznapredovale bolesti jetre (npr. HE,

Tabela 1. Uzroci kroničnog hepatitisa pasa i pasminska predispozicija

Kategorija bolesti	Uzrok	Pasminska predispozicija
Infekcione	CAV – 1 Hepatitis acidofilnih stanica <i>Leptospira</i> spp. <i>Leishmania infantum</i>	
Metabolička	Nakupljanje bakra	Bedlington terijer Zapadno škotski bijeli terijer Skye terijer Doberman pinč Dalmatinski pas Labrador retriever Ostale pasmine?
	Deficijencija α ₁ - antitripsina	Engleski (i američki?) koker španjel
	Fenobarbiton Primidon Fenitoin	
Toksična	Oksibendazol-dietilkarbamazin Lomustin Karprofen? Aflatoksikoza	Doberman pinč
	Prolazna protoporfirija	Njemački ovčar
Autoimuna		Doberman pinč
		Sve pasmine Koker španjel
Idiopatska		Zapadno škotski bijeli terijer Labrador retriever Njemački ovčar Engleski špringer španjel

koagulopatiju, hipoglikemiju) prognoza je oprezna. Preživi li životinja, moguće su hepatičke leziye poput periportalne duktalne proliferacije, hepatičke fiboze, postnekrotičkog skarificiranja i regenerativnih hepatičkih nodula (Van den Ingh i sur., 2006.).

Kronični hepatitis pasa

Kronični hepatitis, heterogena skupina inflamatorno-nekrotičnih jetrenih bolesti, najčešće se javlja u pasa, dok je u mačaka rijedak. Definicija kroničnog hepatitisa pasa bazirana je na histopatološkim karakteristikama hepatocelularne nek-

roze i apoptoze povezanih s upalom i znacima regeneracije i fibroze (Van den Ingh i sur., 2006.). Histopatološke karakteristike kroničnog hepatitisa su slične usprkos različitim uzrocima. Kronični hepatitis također ima tendenciju progresije u cirozu (Center, 1996., Willard, 2010.).

Etiologija i patogeneza

Idealno bi bilo kada bi se kronični hepatitis klasificirao na temelju etiologije, no, uz iznimku bolesti jetre povezane s nakupljanjem bakra u pasmine Bedlington terijer, uzrok, patogeneza,

anamneza, optimalno liječenje i prognoza za ovu bolest su nepoznati. U tabeli 1. prikazani su neki uzroci kroničnog hepatitisa u pasa i pasminska predispozicija, no ipak je idiopatski kronični hepatitis najčešća klinička dijagnoza (Strombeck i sur., 1988., Sevelius, 1995., Fuentealba i sur., 1997., Poldervaart i sur., 2009.).

Infekciovni uzroci

Virusne su infekcije česti uzrok kroničnog hepatitisa u pasa, ali trenutno nisu kao takve prepoznate u životinja. Leptospiroza u pasa je tipično povezana s akutnom kolestatičkom bolesti jetre i akutnim zatajenjem bubrega, premda perzistentna infekcija može prouzročiti kronični hepatitis bez prisustva azotemije (Bishop i sur., 1979.). Lišmanioza se povezuje s histološkim dokazima kroničnog hepatitisa (Rallis i sur., 2005.), ali kliničkih znakova koji upućuju na zahvaćenost jetre (hepatomegalija, ascites ili žutica) nije bilo.

Akumulacija bakra

Bakar je esencijalni element u tragovima koji je potreban za rad niza fiziološki bitnih enzima. Toksične koncentracije i slobodni intracelularni bakar pokreću oksidativne promjene uzrokujući hepatocelularnu nekrozu i upalu. Akumulacija bakra u jetri može biti povezana sa značajnim oštećenjima jetre rezultirajući akutnim hepatitom, kroničnim hepatitom i cirozom (Hoffmann, 2009.). To je jedan od dobro poznatih uzroka kroničnog hepatitisa pasa, a poznat je i u mačaka ali vrlo rijetko (Haynes i Wade, 1995.). Stupanj oštećenja jetre u korelacijski je s količinom bakra u jetri, ali također i sa subcelularnom lokalizacijom i povezanosti molekula (Hoffmann, 2009.). Upalne promjene u jetri ne javljaju se dok ne dođe do koncentracije bakra od 2000 µg/g tjelesne mase (Thornburg i sur., 1990.).

Potencijalni mehanizmi za akumulaciju bakra u jetri uključuju primarne metaboličke poremećaje u jetri za skladištenje bakra, kolestaza koja prouzroči oslabljenu ekskreciju bakra i povećana apsorpcija bakra (Hoffmann, 2009.). Primarni defekt u metabolizmu bakra u jetri se javlja u Bedlington terijera s genetičkom mutacijom na genu zaslužnom za protein koji transportira bakar te time rezultira defektom u bilijarnoj ekskreciji bakra (van De Sluis i sur., 2002.). U ranim se stadijima bakar raspoređuje u lizosomima te je ozljeda jetre minimalna. No, progresijom bolesti dolazi do jače akumulacije bakra i ozljede jetre postaju značajne. Prosječna koncentracija u Bedlington terijera je otprilike 6 000 µg/g pa sve od 12 000 µg/g tjelesne mase (Rolle i Twedt, 1995.).

Akumulacija bakra u jetri može biti i posljedica, a ne uzrok kroničnog hepatitisa. Budući da se bakar normalno izlučuje putem žuči, kronična kolestaza i oslabljen tok žuči može rezultirati sekundarnom akumulacijom bakra; takva akumulacija bakra je većinom periportalna i manja od 2 000 µg/g tjelesne mase (Rolle i Twedt, 1995.).

Mnogi psi s kroničnim hepatitom povezanim s bakrom imaju i povišene koncentracije željeza u jetri. Željezo u jetri većinom je u korelaciji sa stupnjem upale (Schultheiss i sur., 2002.).

Deficijencija α1 – antitripsina

α1 – antitripsin je inhibitor proteaze u cirkulaciji koji je sintetiziran i izlučuje se preko jetre. Autori se većinom slažu da akumulacija α1-antitripsina može igrati ulogu, ali ne može se sa sigurnošću reći da rezultira kroničnom bolesti jetre (Sevelius i sur., 1994.).

Lijekovi i toksini

Lijekovi i toksini su potencijalni uzroci kroničnog hepatitisa. Lijekovi u kontekstu kojih se spominje kronični hepatitis su antikonvulzivi (fenobarbiton, primidon,

fenitoin), oksibendazol-dietilkarbamazin, lomustin i moguće karprofen. Konični hepatitis i ciroza su široko prepoznati kao posljedice dugoročne terapije fenobarbitonom (Dayrell-Hart i sur., 1991.). Izloženost aflatoksinima iz kontaminirane komercijalne hrane za pse obično se povezuje s ALF-om, ali dugotrajna izloženost malim količinama može prouzročiti konična oštećenja jetre (biljarna hiperplazija, fibroza, nodularna regeneracija) (Kroeze i sur., 2006.).

Autoimiuni/imunološki procesi

Autoimiuni hepatitis nije zabilježen u pasa, no ipak neki psi s koničnim hepatitism dobro odgovaraju na terapiju kortikosteroidima što se može usporediti s autoimunim hepatitism u ljudi (Strombeck i sur., 1988.).

Klinička slika

Anamneza i klinička slika u pasa s koničnim hepatitism indiciraju na navedenu bolest, ali su slični bez obzira na primarni uzrok. Znaci su većinom u početku slab i nespecifični poput: anoreksije, letargije, povraćanja, proljeva, gubitka težine i PU/PD. Snažno oštećenje jetre prouzroči zatajenje jetre i znakove poput ascitesa, žutice i HE. Prisutnost žutice i HE govore u prilog progresiji koničnog hepatitisa u cirozu, a ascites je loš indikator (Poldervaart i sur., 2009.). Melena povezana s gastroduodenalnim ulceracijama ili koagulopatijama se također češće javlja uz protrahiranu bolest (Sevelius, 1995.). Kliničko patološka obilježja koja idu u prilog koničnog karaktera bolesti su slaba tjelesna kondicija, ascites, mikrohepatija i histološki znaci fiboze (Washabau, 2013.).

Dijagnoza

U ranim (supkliničkim) stadijima bolest je asimptomatska i jedino ju je moguće uočiti biokemijskom pretragom u kojoj je povišena aktivnost jetrenih enzima. Serumska aktivnost ALT-a može biti povišena i do 10 puta. Varijacije u kretanju vrijednosti ALT-a predstavljaju ciklički karakter bolesti kao i stupanj nekroze koji neprestano varira. Serumska aktivnost ALP-a isto je tako povišena, ali magnituda povišenja je generalno niža nego kod ALT-a. Kada konični hepatitis napreduje prema cirozi, aktivnost jetrenih enzima može biti u fiziološkom rasponu, posljedično smanjenoj parenhimskoj masi jetre (Center, 2007.). Promjene u biokemijskom profilu poput hiperbilirubinemije, hipoalbuminemije, smanjenog BUN-a (Engl. *Blood Urea Nitrogen*; amonijak iz krvi), hipoglikemije i povišenih SBA upućuju na kasnije stadije jetrene bolesti (Sevelius, 1995.). Blaga neregenerativna anemija isto tako može biti odraz konične bolesti, dok se regenerativna anemija može javiti posljedično gubitku krvi zbog koagulopatije ili zbog krvarenja iz ulkusa u GI traktu. Poremećaji u hemostazi (produljeni aPTT i PT) indiciraju na jaku disfunkciju jetre ili DIC; prolongiran PT i trombocitopenija mogu biti negativni prognostički faktori (Center, 1996.).

Rentgenološka pretraga je negativna, osim u kasnijim stadijima kada se može uočiti mikrohepatija ili ascites. U ranim stadijima koničnog hepatitisa, ultrazvučna pretraga može biti fiziološka ili se mogu uočiti blage promjene u ehogenosti. Kada je došlo do razvitka ciroze mogu se uočiti mikrohepatija, nepravilni rubovi jetre, fokalne lezije u obliku regenerativnih nodula, ascites, pojačana ehogenost parenhima povezana s proraštanjem fibroznog tkiva, a mogu se detektirati i splenomegalija i PSS (Washabau, 2013.).

Biopsija jetre je ključna za dijagnozu koničnog hepatitisa. Biopsati pasa s

kroničnim hepatitisom bi se rutinski trebali testirati na akumulaciju bakra (Washabau, 2013.).

Terapija

Preporuke za terapiju kroničnog hepatitisu su najčešće empirijske; ako se može ustvrditi mogući uzrok bolesti, tada treba provesti usmjerenu etiološku terapiju npr. prekid terapije fenobarbitonom, terapija leptospiroze ili kelacija bakra s penicilaminom (Washabau, 2013.).

Kortikosteroidna terapija je opravdana u pasa s histološkim karakteristikama aktivne upale i perzistentnim porastom aktivnosti jetrenih enzima, tek kada su isključeni svi poznati uzroci kroničnog hepatitisu, uključujući infektivne bolesti (Strombeck i sur., 1988.). Nepoznata je optimalna doza kortikosteroida, no u pasa s kroničnim hepatitisom se najčešće preporučuje prednizolon u incijalnoj dozi 1-2 mg/kg/ dan p.o. i onda postupno smanjuje na 0,5-1,0 mg/kg svakih 48 h. Komplikacije kortikosterodine terapije su GI krvarenja, sekundarne infekcije, iatrogeni Cushing i pogoršanje ascitesa. Deksametazon (0,2 mg/kg p.o. svakih 24 h) se preferira u pasa s ascitesom ili edemom, jer nema učinka na aktivnost mineralokortikoida koji bi mogli pogoršati ove znakove (Washabau, 2013.). Prednizon se često koristi u kombinaciji s azatiprinom, pogotovo ako dođe do nuzučinaka prednizona. Doza azatioprina je 1-2 mg/kg/dan p.o. svaka 24 h tijekom jednog do dva tjedna. Nakon toga se smanjuje na svakih 48 h za održavanje terapije. Prednizon se daje u druge dane u dozi 0,5-1 mg/kg/dan. Budući da azatioprin prouzroči supresiju koštane srži i akutnu hepatotoksičnost, potrebno je uzeti krv za KKS i biohemski profil. Odgovor na terapiju će se najbolje provjeriti biopsijom nakon 3-6 mjeseci od početka terapije, budući da kortikosteroidi povisuju aktivnost je-

trenih enzima (osobito ALP-a). Ako dođe do prekida terapije kortikosteroidima, preporučuje se redovito pratiti biohemiske vrijednosti jetrenih enzima kako bi se utvrdio eventualni povratak bolesti (Washabau, 2013.).

Psi s koncentracijom bakra višom od 1 500 µg/g se trebaju tretirati kelatorom bakra, penicilaminom u dozi 10-15 mg/kg p.o., svakih 12 h. Obično su potrebni mjeseci do godine kako bi se snizila koncentracija bakra. Česti nuzučinci terapije penicilaminom uključuju anoreksiju, nauzeju i povraćanje što se može smanjiti davanjem tablete s manjom količinom hrane. Kelator bakra, trientin (10-15 mg/kg p.o. svakih 12 h), je također učinkovit u smanjenju koncentracije bakra, ima manje nuzučinaka od penicilamina i učinkovit je u pasa s hemolitičkom anemijom povezanom s oslobođanjem bakra iz nekrotičnih hepatocita (Rolle i Twedt, 1995.). Oralna aplikacija cinkovih soli se može koristiti za provođenje terapije nakon keliranja bakra ili kao inicijalna terapija u pasa s koncentracijom bakra između 400 µg/g i 1 500 µg/g tjelesne mase. Cinkov acetat se daje u dozi od 100 mg p.o. svakih 12 h tijekom 2-3 mjeseca te potom kao doza državanja 50 mg p.o. svakih 12 h. Potrebna su minimalno 3 mjeseca terapije s cinkom prije nego što je blokiran prolaz bakra probavnim traktom (Brewer i sur., 1992.).

Prehrana koja ima niske doze bakra je najvažnija u rješavanju ranih (supkliničkih) znakova akumulacije bakra u pasa s primarnim metaboličkim poremećajima jetrenog metabolizma bakra (Washabau, 2013.).

Liječenje s antioksidansima poput S-adenozilmletonina (SAMe); 20 mg/kg p.o. svakih 24 h, mljekom čička (Silmarin; 3-6 mg/kg p/o svaka 24 h), ili vitaminom E (10-15 IU/ kg svaka 24 h) je korisno, jer se vjeruje da oksidativni stres igra ulogu u oštećenjima jetre nastalih akumulacijom bakra i nekrotično-upalnih poremećaja (Spee i sur., 2006.).

Prognoza

Odgovor na terapiju kroničnog hepatitisa je dosta varijabilan, što ne iznenađuje, budući da je ovo stanje zapravo heterogena skupina bolesti. Neki psi eventualno mogu prestati s terapijom, ali se češće terapija mora provoditi neodređeno dugo. Neki psi uopće ne odreagiraju na terapiju, osobito oni koji imaju uznapredovali stadij bolesti i cirozu (Poldervaart i sur., 2009.).

Sažetak

Parenhimatozna oštećenja jetre u pasa i mačaka posljedica su toksičnog djelovanja različitih lijekova (fenobarbiton, potencirani sulfonamidi, diazepam i dr.), infekcije (leptospiroza, coronavirusna infekcija, toksoplamoza i dr.), biljnih i dijetalnih preparata, bioloških toksina (aflatoksikoza), aditiva u hranidbi (akumulacija bakra u jetri), neoplazije, hipoksije ili ishemije te konačno, traume. Oštećenje bilo kojeg uzroka po svome tijeku i stupnju promjena na jetri može biti akutno i kronično. Zbog vrlo nespecifične kliničke slike i blagih (ili odsutnih) simptoma, nerijetko se događa da akutna bolest jetre prelazi u kroničnu, koja je u slučaju ciroze ireverzibilna, no mogućnost oporavka ipak postoji uz fibrozu. Što se tiče akutnog hepatitisa, uz odgovarajuću terapiju životinje se najčešće u potpunosti oporave. Simptomi bolesti jetre najčešće ovise o stupnju oštećenja i to su više prisutni što je bolest više uznapredovala. Iako su simptomi nespecifični najčešće se javljaju letargija, mršavost, PU/PD, žutica, poremećaji zgrušavanja i ascites. Za dijagnozu parenhimatozne bolesti jetre neizostavna je biokemijska pretraga aktivnosti jetrenih enzima, ultrazvučna pretraga, rentgenološka (ima manje značenje), no, na žalost, često se konačna dijagnoza može postaviti tek patohistološkom pretragom nakon uzimanja biopsata.

Ključne riječi: parenhimatozna oštećenja jetre, pas, mačka

Literatura

1. BISHOP, L., J. D. STRANDBERG, R. J. ADAMS et al. (1979): Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospires. Am. J. Vet. Res. 40, 839-844.
2. BREWER, G. J., R. D. DICK, W. SCHALL et al. (1992): Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 564-568.
3. CENTER, S. A. (1996): Chronic hepatitis, cirrhosis, breed-specific hepatopathies, copper storage hepatopathy, suppurative hepatitis, granulomatous hepatitis, and idiopathic hepatic fibrosis. In: Strombeck's Small Animal Gastroenterology (GUILFORD W. G., S. A. CENTER, D. R. STROMBECK et al. Eds.), ed. 3, Philadelphia, WB Saunders, pp. 705-765.
4. CENTER, S. A. (2007): Interpretation of liver enzymes. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 37, 297-333.
5. COOPER, J. and C. R. L. WEBSTER (2006): Acute liver failure. Comp. Contin. Educ. 28, 498-514.
6. CULLEN, J. M. (2009): Summary of the World Small Animal Veterinary Association standardization committee guide to classification of liver disease in dogs and cats. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 39, 395-418.
7. DAYRELL-HART, B., S. A. STEINBERG, T. J. VANWINKLE et al. (1991): Hepatotoxicity of phenobarbital in dogs: 18 cases (1985-1989). J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 1060-1066.
8. FAVIER, R. P. (2009): Idiopathic hepatitis and cirrhosis in dogs. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 39, 481-488.
9. FUENTEALBA, C., S. GUEST, S. HAYWOOD et al. (1997): Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. Can. Vet. J. 38, 365-373.
10. HARTMAN, E. G., T. S. G. A. M. VAN DEN INGH and J. ROTHUIZEN (1986): Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. Vet. Immunol. Immunopathol. 13, 261-291.
11. HAYNES, J. S. and P. R. WADE (1995): Hepatopathy associated with excessive hepatic copper in a Siamese cat. Vet. Pathol. 32, 427-429.
12. HOFFMANN, G. (2009): Copper-associated liver diseases. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 39, 489-511.
13. KROEZE, E. J., J. ZENTEK, A. EDIXHOVEN-BOSDIJK et al. (2006): Transient erythropoietic protoporphyria associated with chronic hepatitis and cirrhosis in a cohort of German Shepherd dogs. Vet. Rec. 158, 120-124.
14. POLDERVAART, J. H., R. P. FAVIER, L. C. PENNING et al. (2009): Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006). J. Vet. Intern. Med. 23, 72-80.
15. RALLIS, T., M. J. DAY, M. N. SARIDOMICHELAKIS et al. (2005): Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. J. Comp. Pathol. 132, 142-152.
16. ROLFE, D. S. and D. C. TWEDT (1995): Copper-associated hepatopathies in dogs. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 25, 399-417.
17. RUTHERFORD, A. and R. T. CHUNG (2008): Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. Semin. Liver Dis. 28, 167-174.

18. SCHULTHEISS, P. C., C. L. BEDWELL, D. W. HAMAR et al. (2002): Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. *J. Vet. Diag. Invest.* 14, 396-402.
19. SEVELIUS, E., M. ANDERSSON and L. JONSSON (1994): Hepatic accumulation of alpha-1-antitrypsin in chronic liver disease in the dog. *J. Comp. Pathol.* 111, 401-412.
20. SEVELIUS, E. (1995): Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 36, 521-528.
21. SPEE, B., B. ARENDS, T. S. VAN DEN INGH et al. (2006): Copper metabolism and oxidative stress in chronic inflammatory and cholestatic liver diseases in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 1085-1092.
22. STROMBECK, D. R., L. M. MILLER and D. HARROLD (1988): Effects of corticosteroid treatment on survival time in dogs with chronic hepatitis: 151 cases (1977-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1109-1113.
23. THORNBURG, L. P., G. ROTTINGHAUS, M. McGOWAN et al. (1990): Hepatic copper concentrations in purebred and mixed-breed dogs. *Vet. Pathol.* 27, 81-88.
24. VAN DEN INGH, T., T. VAN WINKLE, J. M. CULLEN et al. (2006): Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. 2. Hepatocellular death, hepatitis and cirrhosis. In: *WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease* (Rothuizen, J., ed.). Edinburgh, WB Saunders, pp. 85-101.
25. VAN DE SLUIS, B., J. ROTHUIZEN, P. L. PEARSON et al. (2002): Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum. Mol. Genet.* 11, 165-173.
26. WASHABAU, R. J. (2013): Diseases of the Gastrointestinal Tract. In: *Canine & Feline gastroenterology* (Washabau R. J., M. J. Day, eds.). Elsevier Saunders, Missouri, pp. 849-904.
27. WEBSTER, C. R. L. and J. COOPER (2009): Therapeutic use of cytoprotective agents in canine and feline hepatobiliary disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 39, 631-652.
28. WILLARD, M. D. (2010): Inflammatory canine hepatic disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (Ettinger S. J., E. C. Feldman Eds.), ed. 7, St. Louis, WB Saunders, pp. 1637-1642.

Parenchymal Liver Disorders in Dogs and Cats - (Part I.)

Kristina LUČIĆ, DVM, Croatia; Dalibor POTOČNJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

The main causes of parenchymal liver disorders in dogs and cats are drug induced toxicity (phenobarbital, potentiated sulphonamids, diazepam, etc.), infectious agents (leptospirosis, coronavirus, toxoplasmosis, etc.), herbal and dietary supplements, biological toxins (aflatoxin), food additives (xylitol), chemicals, metabolic disorders (hepatic copper accumulation), neoplastic disorders, hypoxic/ischemic disorders and finally, trauma. In terms of its progress and severity, every disorder can be characterized as acute or chronic. As a result of unspecific clinical appearance and mild (or even subclinical) symptoms, very often acute liver disease can progress into chronic liver disease. In the case of cirrhosis, this is irreversible, though recovery is possible in

the case of fibrosis. In acute hepatitis, animals can recover completely if proper therapy is maintained. Clinical significance depends on the rate of the disorder, and the more damage present, the more symptoms occur. Although symptoms are mainly unspecific, the most common are lethargy, leanness, PU/PD, jaundice, coagulation disorders, and ascites. To diagnose parenchymal liver disorders, biochemical blood testing is just as essential as sonography or radiography (which is less significant), but unfortunately, in many cases, these kind of disorders can only be diagnosed after pathohistological examination of the liver biopsy.

Key words: *Parenchymal liver disorders, Dog, Cat*

florogen 30%

300 mg/ml, otopina za injekciju
florfenikol



A large, close-up black and white photograph of several cows' heads, looking directly at the camera. They have distinct black and white markings on their faces and ears.



300 mg/ml
OTOPINA ZA
INJEKCIJU

- Učinkovito liječenje infekcija dišnih organa u goveda i svinja
- Jednokratna subkutana ili dvokratna intramuskularna primjena

Operacijsko liječenje luksacija kukova u pasa

M. Kreszinger*, Martina Ivković, B. Radišić, M. Pećin i Marija Lipar



Luksacija kuka je čest posttraumatski ortopedski problem koji obuhvaća 90% svih luksacija zglobova u pasa (Denny i Butterworth, 2000.), prilikom čega se kao posljedica javlja gubitak funkcije jednog ili, u slučaju bilateralne luksacije, oba stražnja ekstremiteta. Pod luksacijom kuka podrazumijeva se dislokacija bedrene kosti u odnosu na zglobnu čašicu (Fossum i sur., 1997.).

Opseg traume mekih česti ovisi o uzroku luksacije (Fossum i sur., 1997.). Vrlo rijetko dijelovi dorzalnog svoda zglobne čašice (*lat. acetabulum*) ili glave bedrene kosti, kada govorimo o avulziji, mogu biti zahvaćeni frakturom (Brinker i sur., 1997.). Ligament glave bedrene kosti (*lat. lig. teres*) uvijek se u potpunosti kida, bez obzira radi li se o intersticijalnoj rupturi ili avulziji ligamenta u području jamice glave bedrene kosti (*lat. fovea capitis*). Fibrozna kapsula zgloba pri luksaciji kuka neminovno je u cijelosti rupturirana (Fossum i sur., 1997.). Postoperacijsko cijeljenje zglobne kapsule stvaranjem fibroznog tkiva zahtijeva najmanje četrnaest dana (McLaughlin i Tillson, 1994.).

Liječenje luksacija treba učiniti što prije, kako bi se sprječila daljnja povreda mekih česti koje okružuju zglog te degeneracija zglobne hrskavice. Većina pacijenata može biti isključivo

konzervativno liječena, a u kroničnim slučajevima kao i u slučajevima s višestrukim ozljedama odmah pristupamo operativnom liječenju (Fossum i sur., 1997.).

Operativne tehnike uključuju intraartikularne i ekstraartikularne metode stabilizacije (Özaydin i sur., 2003.). U slučajevima luksacije kuka kada nije moguće postići repoziciju zbog prisutne displazije, ozbiljnih oštećenja zglobne hrskavice, nepopravljivih



Slika 1. Radiološki ventrodorzalni prikaz bilateralne kraniodorzalne luksacije kukova psa

Dr. sc. Mario KRESZINGER*, dr. med. vet., izvanredni profesor, (dopisni autor, e-mail: kreszinger@vef.hr), dr. sc. Berislav RADIŠIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Marko PEĆIN, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Marija LIPAR, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, viša stručna suradnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Martina IVKOVIĆ, dr. med. vet., Privatna praksa "Delonga", Split, Hrvatska

pratećih frakturnih acetabuluma ili frakture glave bedrene kosti, izvodi se ekskizjska artroplastika ili ugradnja endoproteze (Brinker i sur., 1997.).

Vrste luksacija

Luksacije se kuka s obzirom na dislokaciju bedrene kosti u odnosu na acetabulum dijele na:

1. Kraniodeltalna luksacija

Glava bedrene kosti nalazi se dorzalno i kranijalno u odnosu na acetabulum (Brinker i sur., 1997.). Većina luksacija (75%) je kraniodeltalna (Tobias i Johnston, 2012.).

2. Kaudoventralna luksacija s uklještenjem glave bedrene kosti u obturatornom otvoru

Glava bedrene kosti nalazi se ventralno u odnosu na acetabulum, najčešće u obturatornom otvoru ili kranijalno od njega (Brinker i sur., 1997.).

3. Medijalna luksacija povezana s frakturom acetabuluma

Do medijalne luksacije kuka dolazi u slučaju frakture acetabuluma (Manley, 1993.).

4. Kaudodeltalna luksacija

Glava bedrene kosti u odnosu na acetabulum nalazi se kaudalno i dorzalno (Brinker i sur., 1997.).

Klinički nalaz

Na luksaciju kuka se posumnjava kada životinja pokazuje visok stupanj hromosti stražnjom nogom, odnosno ne oslanja se istom, a anamnestički je utvrđena povijest traume. Klinički pregled otkriva bol i krepitacije pri fleksiji i ekstenziji kuka (Manley, 1993.). Kaudodeltalna luksacija može biti posljedica kraniodeltalne luksacije s velikim udjelom nestabilnosti, dopuštajući da se glava bedrene kosti naknadno pomakne kaudalno. U ovom slučaju glava bedrene kosti leži kaudalno i dorzalno od acetabuluma te postoji rizik oštećenja ishijadičnog živca. Dolazi

do povećanja dužine ekstremiteta, kada se udovi ekstendiraju kaudalno ali i do skraćenja ukoliko se udovi polože ventralno. U stojnom stavu psa zahvaćeni ekstremitet je abduciran uz istovremenu unutarnju rotaciju koljena i vanjsku rotaciju tarzusa. Pri palpaciji se palpira suženje prostora između velikog trohantera i ishijadične kvrge. Kranoventralne luksacije su obično u početku kraniodeltalne kojima je naknadno manipulirano do ventralne pozicije prije postavljanja konačne dijagnoze (Brinker i sur., 1997.).

Pri kraniodeltalnoj luksaciji dorzalni pomak trohantera, a u odnosu na sjednu krvru i kraniodeltalni dio crijevne kosti, može se i palpatorno utvrditi. U usporedbi s nezahvaćenom stranom često utvđujemo nepodudarnost u poziciji trohantera. U okviru palpatorne pretrage postavimo li palac između velikog trohantera i sjedne kvrge pri vanjskoj rotaciji bedrene kosti fiziološki čemo osjetiti depresiju palca u međuprostoru. Ekstremitet je abduciran i prisutna je vanjska rotacija koljena. Ukoliko se radi o kraniodeltalnoj luksaciji, kaudalna ekstenzija stražnjih ekstremiteta može pokazati relativno skraćenje zahvaćenog uda. U slučaju kaudoventralne luksacije zahvaćeni se ekstremitet doima duljim nego kontralateralna strana. Zbog medijalnog pomaka trohanter je teško palpatorno izdiferencirati. Radiološka pretraga je obvezatna kako bi se dijagnoza objektivno potvrdila. Izvode se ventrodorsalni i lateralni prikaz da bi se procijenila luksacija, prisutnost ili odsutnost avulzijskih frakturnih glave bedrene kosti, frakture vrata bedrene kosti, glava bedrene kosti, ili acetabularne frakture, kao i degenerativne bolesti zglobova (Manley, 1993.).

Diferencijalno dijagnostički u obzir se uzima akutna subluksacija kuka posljedično displaziji, fizealni lom glave bedrene kosti, lom vrata bedrene kosti i lom acetabuluma (Fossum i sur., 1997.).

Načini operacijskog liječenja luksacija kuka

Slučajevi u kojima kuk ostaje nestabilan nakon zatvorene repozicije ili u kojima je glava bedrene kosti neuspješno bila reducirana zahtijeva otvoren pristup, odnosno operacijsko pristupanje mjestu luksacije. Otvoren pristup je uvijek potreban za liječenje popratnih avulzijskih frakturna glave bedrene kosti kao i u situacijama u kojima se zahtijeva trenutna mobilnost pacijenta u cilju što boljeg liječenja popratnih ozljeda. Ukoliko je moguće repoziciju bi trebalo učiniti neposredno prije operacijskog zahvata što pristup kuku čini lakšim. Najčešće korišten, osobito kada je kuk reponibilan, odgovarajući je kraniolateralni operacijski pristup kuku. Ukoliko zglobna kapsula ne može biti adekvatno sašivena ili ako kuk nije reponibilan, kraniolateralni pristup se proširuje incizijom glutealne teticе dubokog glutealnog mišića. U slučajevima da ni incizija glutealne teticе nije dovoljna može se učiniti trochanterotomija u okviru dorzalnog pristupa kuku. Ovaj pristup je metoda izbora kod kroničnih luksacija (preko 5-6 dana), ili ukoliko je potrebna opsežna rekonstrukcija. Nakon što je zglob prikazan cilj je odstraniti ili reponirati meke česti koje mogu sprječavati ulaz glave femura u acetabulum, zatim reponirati glavu bedrene kosti u acetabulum i konačno ju stabilizirati. Avulzijom zahvaćeni dijelovi kosti se uklanjaju, osim u rijetkim slučajevima gdje su dovoljno veliki da se mogu osteosintezom reponirati i učvrstiti. Nakon uklanjanja dijela glave bedrene kosti donosi se odluka glede moguće stabilnosti ostatka glave bedrene kosti. Ako se čini da preostala glava neće pružiti primjerenu zglobnu površinu, potrebljeno je učiniti ekszizijsku artroplastiku glave i vrata bedrene kosti ili se pristupa ugradnji endoproteze.

Tehnika se ne odabire prema uspješnosti, jer sve tehnike prema literaturnim podatcima imaju

prijavljenu podjednaku uspješnost, već prema prihvativosti operateru i kompatibilnosti s raspoloživom opremom (Brinker i sur., 1997.).

Mogući problemi operacijskih tehnika uključuju ponovljene ili rekurentne luksacije, migraciju implantata ili njihovu neuspješnost, neurološka oštećenja, infekcije, ozljede artikularne hrskavice ili periartikularnih tkiva. Postotak neuspješnosti konzervativnih metoda je 50%-70%. Stoga operacijske tehnike pružaju bolju stabilnost te niži postotak reluksacija nego konzervativne metode (Serdy i sur., 1999., Özaydin i sur., 2003.).

Šivanje zglobne kapsule

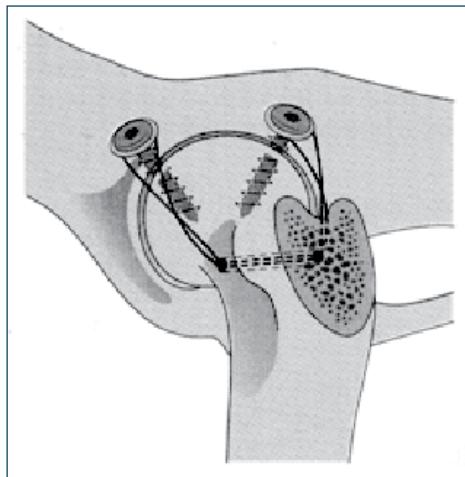
Nije neobično da je kapsula očuvana osim malog otvora kroz koji se kuk luksirao ili na mjestu prihvaćanja na vratu bedrene kosti. U obje situacije, ako je nakon redukcije glave bedrene kosti stabilnost zadovoljavajuća kroz opseg kretnji, primarno šivanje kapsule može biti jedina korištena tehnika (Fossum i sur., 1997.). Kapsula se šiva neresorptivnim ili spororesorptivnim koncem koristeći pojedinačan šav ili šav madracu. Postoperacijski kuk se imobilizira Ehmerovim povojem na 7-10 dana (Manley, 1993.).

Tehnika sintetske kapsule

Nakon redukcije, dva vijka prikladnog promjera (2,7 mm do 4,0 mm) postavljaju se na dorzalni rub acetabuluma, na pozicije koje odgovaraju kazaljkama na 10 i 13 sati za lijevi kuk, i 11 i 14 sati za desni kuk. Mora se voditi računa o tome da vijci ne penetriraju u samu zglobnu hrskavicu (Brinker i sur., 1997.). Ako kapsula može biti sigurno sašivena, tehnika sintetske kapsule će najčešće biti sama po sebi dovoljna za postizanje postoperacijske stabilnosti kuka (Brinker i sur., 1997.).

Tehnika priteznim sidrom (Engl. Toggle Pin)

Ukoliko je kapsula suviše oštećena ili je luksacija kronična, često nije moguće dovoljno stabilizirati zglob samo šivanjem



Slika 2. Stabilizacija kuka izvođenjem sintetske kapsule (Fossum i sur., 1997.).

ostataka zglobne čahure. Pritezno sidro plasiramo kroz acetabularni tunel na medijalnu stranu acetabuluma, a potom se okrene za 90° da bi se zaključao uz medijani zid acetabuluma. Nakon toga konci se provlače kroz prethodno svrđlom formirani tunel u vratu bedrene kosti i drže nategnuti dok se zglob ne reponira.

Potom se buši tunel kranioaudalnog smjera kroz lateralni korteks proksimalno od izlaznog otvora tunela na lateralnom korteksu bedrene kosti. Jedan par konca se provlači kroz drugi načinjeni tunel i vezuje sa suprotnim parom na lateralnoj strani korteksa bedrene kosti. Zglobna kapsula se šiva, a veliki trohanter se reponira s dvije Kiršnerove žice i serklažom. Za ovako implantiran sintetski okrugli ligament glave bedrene kosti ne očekuje se da trajno funkcioniра, već je cilj zadržavanje stabilnosti zgloba u periodu dok okolne ozlijedene meke česti ne zaciјele, kao i dok ožiljkasto tkivo ne sazrije (Brinker i sur., 1997.).

Modifikacija prethodno opisanoj tehnici uključuje izbjegavanje osteotomije velikog trohantera, kao i bušenje tunela na bedrenoj kosti. Pritezanje i čvoranje konca vrši se preko polipropilenskog gumba s dvije rupe. Kao indikacije



Slika 3. Ventrodorzalni rentgenski prikaz bilateralno saniranih kukova tehnike priteznog sidra i koštanih sidra.

za ovu tehniku navode se luksacije kukova koje zahtijevaju ranu mobilnost uslijed višestrukih ortopedskih ozljeda (Beckham i sur., 1996.).

Ekstraartikularna stabilizacija resorptivnim materijalom–ili femoralni šav (tzv. „Tehnika prema Martini-u“)

Ova metoda je jednostavna, i učinkovita u liječenju kroničnih i akutnih luksacija kuka. Na crijevnoj kosti cca 2 cm kranijalno od acetabuluma se buši tunel, u dorzoventralnom smjeru.

Drugi se tunel buši na bazi velikog trohantera u kaudokranijalnom smjeru pri kutu od 90° na dugu os bedrene kosti.

Konac se provlači kroz crijevnu kost u lateromedijalnom smjeru, a dorzalni kraj konca se dalje provlači kroz tunel bedrene kosti u kranioaudalnom smjeru ispod glutealne muskulature kako bi se oba kraja konca dovela na kaudalnu stranu bedrene kosti (Martini i sur., 2001.).

Način čvoranja konca je najvažniji dio zahvata, jer se stabilnost kuka postiže samo točnom pozicijom bedrene kosti i primjerenom tenzijom niti. Pri čvoranju kuk je u abdukciji i unutarnjoj rotaciji (Martini i sur., 2001.).

Modifikacija tehnike prema Martiniu razlikuje se od izvorne tehnike prema mjestu postavljanja kirurškog materijala, umjesto kroz tunel bedrene kosti, konac se provlači kroz čvrsto fibrozno tkivo na hvatištu ravnog bedrenog mišića (lat. *m. rectusa femoris*) (Shani i sur., 2004.).

Ekscizijska artroplastika

Ostektomija glave i vrata bedrene kosti (Engl. *Femoral head osteotomy, FHO*) je zahvat indiciran u slučajevima kroničnih dugotrajnih luksacija, luksacija popraćenih avulzijom i jačim oštećenjima zglobne hrskavice kao i slučajevima kada ugradnja endoproteze nije moguća (Vasseur, 1990.), a uključuje uklanjanje femoralnog dijela zgloba kuka, odnosno glave i vrata bedrene kosti. Nakon zahvata uklonjen je kontakt između površinskih dijelova degenerirane hrskavice i subhondralne kosti kuka (Rawson, 2005.). Radi se s ciljem uklanjanja boli uslijed sudaranja zglovnih ploha te zbog omogućavanja kasnijeg nastanka ožiljkastog, fibroznog „lažnog zgloba“. Ova se metoda smatra zadnjom metodom izbora, no ipak rezultira poboljšanjem kvalitete kretanja i života psa (Brinker i sur., 1997.).

Potrebno je poticati što raniju pokretljivost zgloba, radi čega se preporuča započeti s pasivnim kretnjama zgloba već drugi dan nakon operacije, do četiri puta dnevno, sve dok pacijent ne počne sam koristiti nogu u trku (Brinker i sur., 1997.). Općenito, bolji se oporavak očekuje kod manjih pasmina pasa ispod 30 kg tjelesne mase (Vasseur, 1990.).

Endoproteza (Umjetni kuk, engl. Total Hip Replacement, THR)

Kirurški zahvat kao što je umjetni kuk indiciran je kao metoda liječenja traumatskih luksacija kukova koje su komplikirane već postojećim zglobnim oboljenjima, prisutnim frakturama i rekurentnim luksacijama (Pozzi i sur., 2004.). Endoproteze se dijele na cementne

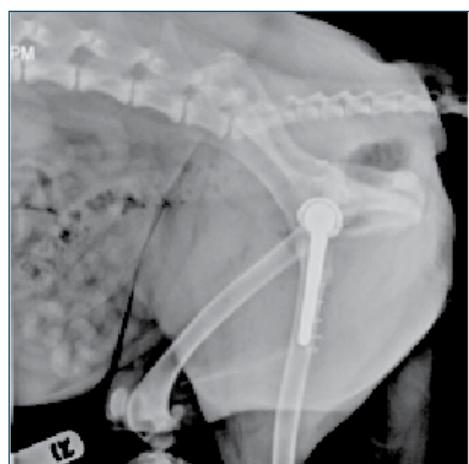
i bescementne. Idealni kandidati za ovaj tip zahvata su psi u dobi nakon intenzivnog rasta i razvoja, stariji od 10 mjeseci, koji nisu pretili i slobodni su od infekcija (Gutbrod i Festl, 1995.).

Novija tehnologija proizvodnje, posebice što se tiče obrade kontaktne površine proteza, kao i materijala (titan), proizvodi proteze koje omogućuju osteointegraciju, odnosno integraciju implantata s kosti. Biomedtrixov tip proteze pod nazivom BFXT™ (Engl. Biologic fixation) predstavlja jednu od prvih proteza ove skupine (Olmstead, 1995.).

Švicarska tvrtka Kyon je 1999. godine komercijalizirala bescementne endoproteze novije generacije. Kyonove se endoproteze sastoje od titanskih komponenti, a osnovna karakteristika ove proteze je koštano uraštanje acetabularne čašice i učvršćenje femoralnog klina kortikalnim vijcima. Ovaj sustav kombinacijom različitih komponenti glave i vrata prilagođava se kako velikim, tako i malim pasminama pasa (Tepic, 2008.).

Postoperativna njega

Njega pacijenata s luksacijom kuka sastoji se od mirovanja i ograničene



Slika 4. Lateralni radiološki prikaz cementne endoproteze



Slika 5. Lateralni radiološki prikaz bescementne endoproteze

tjelesne aktivnosti u periodu od 4-6 tjedana kako bi meke česti bolje zarašle. Nakon zatvorenog pristupa pogodjeni se ud stavlja u povoj koji ne dopušta oslanjanje (najčešće „Ehmerov povoj“) kroz 7-14 dana, pazeci na komplikacije koje pritom mogu nastati. Ipak, nakon otvorenog pristupa, najčešće se ne koriste ovakvi povoji što omogućuje ranu mobilnost zgloba. Multimodalni se pristup, u vidu pravilnih vježbi, hrandibe, fizikalne terapije, lijekova koji umanjuju osteoartritis te protuupalni lijekovi koristi kako bi se umanjio osteoartritis kao česta posljedica luksacija kuka (Tobias i Johnston, 2012.).

Fizikalna terapija

Fizikalna terapija usmjerenja je prije svega na jačanje mukulature čime se povećava stabilnost i funkcija zglobova. Hidroterapija zauzima ključno mjesto. Rasterećenjem tjelesne mase u vodi smanjuje se opterećenje kralješnice i ekstremiteta što omogućava

veću pokretljivost, tj. povećava opseg kretanja zglobova tijekom vježbanja. Smanjen opseg pokretljivosti zglobova, prouzročen bolom, otokom ili ukočenjem, ovom metodom može se vratiti u fiziološko stanje. Terapeutske vježbe čine osnovu rehabilitacije, bilo da se radi o poslije operacijskom tretmanu ili kroničnim stanjima. Koriste se u cilju poboljšanja fleksije i ekstenzije zglobova, za poboljšanje rastezljivosti mišića, ligamenata i tetiva te za poboljšanje neuromuskularnih funkcija (Bockstahler i sur., 2004.).

Sažetak

Luksacija kuka podrazumijeva dislokaciju glave bedrene kosti prema acetabulumu. Čest je posttraumatski ortopedski problem koji obuhvaća 90% svih luksacija zglobova u pasa. Nakon reponiranja kuka nekoliko je načina zadržavanja njegove pozicije. Šivanje kapsule kuka može biti jedina korištena tehniku. Ukoliko ne može biti dostatno zatvorena koriste se dodatne operacijske tehnike. Unutarzglobne tehnike imaju za cilj obnovu funkcije ligamenta glave bedrene kosti. U ovoj skupini preporučene tehnike su: tehniku priteznog sidra, modificirana tehniku priteznog sidra. Preporučene izvanzglobne tehnike temelje se na rekonstrukciji ili nadomještanju izvanzglobnih stabilizatora kuka. U ovu skupinu pripadaju: tehniku sintetske kapsule, izvanzglobna stabilizacija resorptivnim materijalom – iliofemoralni šav (tkz. tehniku prema Martini-u), transpozicija sakrotuberalnog ligamenta, ekszizijska artroplastika i endoproteza kuka.

Ključne riječi: luksacija kuka, unutarzglobne tehnike, izvanzglobne tehnike, pas

Literatura

1. BECKHAM, H. P. JR., M. M. SMITH and D. A. KERN (1996): Use of a modified toggle pin for repair of coxofemoral luxation in dogs with multiple orthopedic injuries: 14 cases (1986-1994). J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 81-84.
2. BOCHSTAHLER, B., D. LEVINE and D. MILLIS (2004): Methods of physiotherapy. In: Essential facts of physiotherapy in dogs and cats. Rehabilitation

- and pain management. VET VERLAG. Babenhausen, pp. 46-110.
3. BRINKER, W. O., D. L. PIERMATTEI and G. L. FLO (1997): The Hip Joint, In: Handbook of Small animal Orthopedics and fracture repair. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 423-467.
 4. DENNY, H. R. and S. J. BUTTERWORTH (2000): A guide to canine and feline orthopaedic surgery, 4th ed., Oxford, PA Blackwell Science, pp. 445-467.
 5. FOSSUM, T. W., C. S. HEDLUND, D. A. HULSE, A. L. JOHNSON and H. B. SEIM III (1997): Fundamentals of Orthopedic Surgery and Fracture Management, In: Small animal surgery. St. Louis, PA Mosby Inc., pp. 949-956.
 6. GUTBROD, F. and D. FESTL (1995): Practische Anwendung und klinische Ergebnisse der Hüftgelenk - Totalendoprothese für Hunde Modell Aesculap. Kleintierpraxis 40, 793-804.
 7. MANLEY, P. A. (1993): The hip joint. In: Textbook of small animal surgery 2nd (ed. Slatter, D.), W. B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 1786-1805.
 8. MARTINI, F. M., B. SIMONAZZI and M. DEL BUE (2001): Extra-articular absorbable suture stabilization of coxofemoral luxation in dogs. Vet. Surgery 30, 468-475.
 9. McLAUGHLIN, R. M. and D. M. TILLSON (1994): Flexible external fixation for craniodorsal coxofemoral luxation in dogs. Vet. Surgery 23, 21-30.
 10. OLMSTEAD, M. L. (1995): The canine cemented modular total hip prosthesis. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 31, 109-124.
 11. ÖZAYDIN, I., E. KILIC, V. BARAN, I. DEMIRKAN, A. KAMILOGLU and S. VURAL (2003): Reduction and stabilization of hip luxation by the transposition of the ligamentum sacrotuberale in dogs; an in vivo study. Vet. Surgery 32, 46-51.
 12. POZZI, A., M. P. KOWALESKI, J. DYCE and K. A. JOHNSON (2004): Treatment of traumatic coxofemoral luxation by cemented total hip arthroplasty. Vet. Comp. Orthopaed. Traumatol. 4, 198-204.
 13. RAWSON, E., M. G. ARONSOHN and R. L. BURK (2005): Simultaneous bilateral femoral head and neck ostectomy for the treatment of canine hip dysplasia. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 41, 166-170.
 14. SERDY, M. G., K. S. SCHULZ, W. HORNOF, C. KOEHLER, D. CHIN and P. B. VASSER (1999): Closed toggle pinning for canine traumatic coxofemoral luxation. Vet. Comp. Orthopaed. Traumatol. 12, 6-14.
 15. SHANI, J., D. E. JOHNSTON and R. SHAHAR (2004): Stabilization of traumatic coxofemoral luxation with an extra-capsular suture from the greater trochanter of the origin of the rectus femoris. Vet. Comp. Orthopaed. Traumatol. 17, 12-16.
 16. TEPIC, S. (2008): Kyon THR: results and complications, 14th ESVOT Congress, Munich, Germany, pp. 178-179.
 17. TOBIAS, M. K. and S. A. JOHNSTON (2012): Coxofemoral Luxation. In: Veterinary Surgery Small Animall. St. Louis, Elsevier-Saunders, pp. 816-823.
 18. VASSEUR, P. B. (1990): Femoral head and neck ostectomy. In: Bojrab, M. J.: Current techniques in small animal surgery. Lea & Febinger, Philadelphia, pp. 674-682.

Surgical Procedures for Canine Hip Luxations

Mario KRESZINGER, DVM, PhD, Associate Professor, Berislav RADIŠIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Marko PEĆIN, DVM, PhD, Senior Assistant, Marija LIPAR, DVM, PhD, Scientific Advisor, Senior Scientific Associate, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Martina IVKOVIĆ, DVM, Veterinary Practice "Delonga", Split, Croatia

Coxofemoral luxation is a displacement of the femoral head from the acetabulum. It is a common posttraumatic orthopaedic problem and accounts for 90% of all joint luxation in dogs. Following reduction, several choices are available to maintain reduction. Simple closure of the joint capsule can be used as the sole method of reduction. If the capsule cannot be closed simply, additional measures must be taken to ensure stability. Intraarticular techniques rely on reconstruction of the ligament of the head of the femur. Suggested

techniques included in this group are: toggle pin fixation and modified toggle pin fixation. Suggested extraarticular techniques rely on reconstruction or replacement of the extraarticular stabilizers of the hip. These techniques include: synthetic capsule technique, extraarticular absorbable suture stabilization – Martini technique, femoral head and neck ostectomy and total hip replacement.

Key words: Coxofemoral luxation, Intraarticular techniques, Extraarticular techniques, Dog

zagrebački
MASTITIS REAGENS®



Zagrebačkim mastitis reagensom u terenskim uvjetima, može se veoma pouzdano utvrditi zdravstveno stanje mlijecne žljezde tj. da li je sekrecija vimena normalna ili poremećena (patološka).



Proizvodi : Laboratorij za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka

Savska cesta 143, 10 000 Zagreb
telefon: 01/6123666
fax: 01/6190841
e-mail: ured@veinst.hr

Osoblje Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 1979. godine

Ivona Žura Žaja



S lijeva na desno: Ivanka POMPER, mr. sc. Bojana GRADINSKI-VRBANAC, prof. dr. sc. Ivica VALPOTIĆ, Anuška ORMANEC, doc. dr. sc. Dubravko EMANOVIĆ, prof. dr. sc. Dubravko TIMET, Boris PAVAČIĆ, prof. dr. sc. Vladimir MITIN, dr. sc. Petar KRALJEVIĆ, izv. prof. dr. sc. Melita HERAK i Branka KECERIN

mount
trade
GAREŠNICA

richterpharma ag

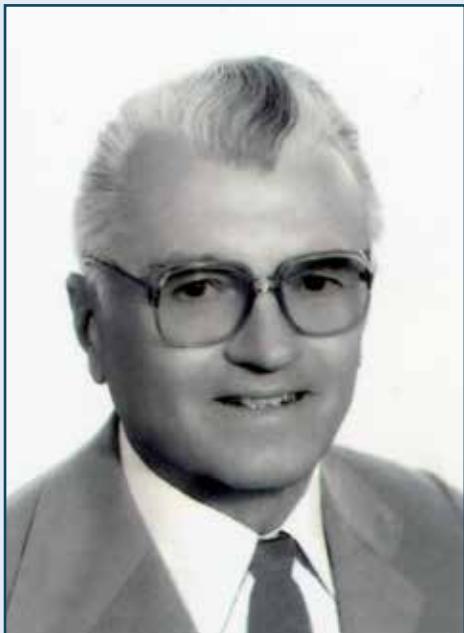
Spasmium®



Trenutno olakšanje.



In memoriam – mr. sc. Stanislav Brezovec, dr. med. vet.



Posljednjeg dana mjeseca srpnja 2016. godine umro je gospodin Stanislav Brezovec, doktor veterinarske medicine. Rodio se 16. ožujka 1931. godine u Nedeljancu, mjestu u neposrednoj blizini Varaždina. Majka Marija podarila je ocu Stjepanu, osim Stanka još četvoro sinova i jednu kćer. Osnovnu školu završio je u Vidovcu, a gimnaziju u Varaždinu. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 18. prosinca 1956. godine. Nakon odsluženja vojnog roka godine 1958. zapošljava se u Veterinarskoj stanici Prelog, područna ambulanta Donja Dubrava, u kojoj je radio do 1964. kada biva premješten u Veterinarsku stanicu Prelog gdje ostaje sve do rujna 1978. godine. U to vrijeme, točnije 22. travnja 1965. godine pri Sekretarijatu za poljorivrednu SR Hrvatske položio je stučni ispit.

Godine 1971., 26. lipnja, završava studij trećeg stupnja te je izradom samostalnog rada na temu „Proizvodnja prasadi u Donjem Međimurju i mogućnosti za njezino unaprjeđenje“, stekao akademski stupanj magistra iz područja „Fiziologija i patologija svinjogojske proizvodnje“. Tijekom vremena, kao autor ili suautor objavio je u domaćim stručnim časopisima desetak stručnih članaka.

Godine 1975. ukazom predsjednika SFRJ Josipa Broza Tita odlikovan je medaljom rada, a 1976. dodijeljena mu je plaketa IV. Kongresa SDV i VT Jugoslavije. Iste godine primio je i priznanje Jugoslavenskog društva za hyologiju i hyojatriju. Gotovo dvadeset godina provedenih u Međimurju ostavilo je neizbrisiv trag u životu kolege Stanka čemu je nebrojno puta svjedočio tijekom naših druženja i ugodnih čakanja.

Ipak, 1. rujna 1978. godine, životni put враћa ga u Varaždin. Na poziv tadašnje Uprave Veterinarske stanice Varaždin, magistar Stanislav Brezovec zapošljava se u Veterinarskoj stanici Varaždin s posebnim zadatkom na unaprjeđenju svinjogojske proizvodnje. Njegova teorijska znanja kao i zavidna praktična iskustva osobito kao patologa bila su uistinu veliko osvježenje Veterinarskoj stanici Varaždin u nastajanju da unapriredi pristup suvremenoj tehnologiji, a posebice nutricionistici u preventivi i kurativi svinjogojske proizvodnje. U siječnju 1986. postavljen je na mjesto direktora OOK „Stočar“ u sastavu Veterinarske stanice Varaždin. Pet godina kasnije, 1. travnja 1991. godine otisao je u zasluzenu mirovinu.

Gospodin Brezovec je bio svestran. Bavio se rekreacijskim trčanjem i hodanjem u prirodi. Desetak puta posjetio je pješke marijansko svetište Mariju Bistrigu

udaljenu oko pedesetak kilometara od Varaždina. Bio je strastveni lovac i ribolovac, streljački instruktor. Kao što to obično biva jedna lijepo uređena podrumска prostorija u obiteljskoj kući prepuna je lovačkih trofeja, pokala, plaketa i medalja te diploma s natjecanja i diploma dodijeljih mu za naročite zasluge i doprinos razvoju ovih sportskih disciplina. Kao srednjoškolac polazio je i prestižnu Glazbenu školu u Varaždinu. U klasi ruske profesorice učio je svirati harmoniku. Bio je nadaren učenik. Sviranjem je kao đak i student i zarađivao što mu je pomoglo pri školovanju, a olakšalo roditeljma ne baš blistav materijalni položaj.

Većinu naših druženja u Stanici obogatio je svojom svirkom i pjevanjem, naročito izvornih međimurskih narodnih pjesama koje je osobito volio. Iako svojim rodom nije imao nikakvu poveznicu s Međimurjem, stvorio je jedan poseban odnos s tim krajem, zavolio je taj kraj

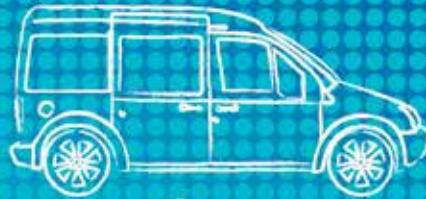
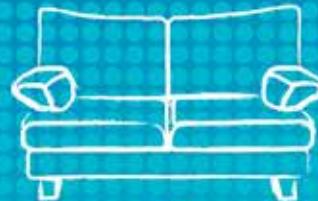
i te ljude kao i oni njega. Počesto im se vraćao osobno ili u sjecanjima. Petnaestak godina, zajedno sa suprugom pjevao je u Zboru časnih sestara Uršulinki koje su ga maestralnom izvedbom, Stanku omiljenih duhovnih pjesama, isparatile na posljednji počinak.

Što reći na kraju? Nedostajat će nam njegov životni optimizam, radost življenja, njegova skromnost, njegova mirnoća i njegova blagost kojom je često pripovjedao o svojim kćerima Suzani i Smiljani te svojoj supruzi Antoniji koju je zapravo od milja zvao Tonek ili Tonica. I ovim im putem izražavamo naše duboko suosjećanje.

Dragi kolega Stanko, hvala vam na svemu, počivajte u miru. Nek Vam je laka ova naša napačena hrvatska gruda. Pokopan je na Gradskom groblju u Varaždinu 2. kolovoza 2016. godine u 14 sati.

Marijan SABOLIĆ

NOVO



FYPRYST® combo

fipronil, S-metopren

Učinkovit na



Sastav Pipeta (0,67 ml) sadržava 67 mg fipronila i 60,3 mg S-metoprena. Pipeta (1,34 ml) sadržava 134 mg fipronila i 120,6 mg S-metoprena. Pipeta (2,68 ml) sadržava 268 mg fipronila i 241,2 mg S-metoprena. Pipeta (4,02 ml) sadržava 402 mg fipronila i 367,8 mg S-metoprena. Pipeta (0,5 ml) sadržava 50 mg fipronila i 60 mg S-metoprena. **Indikacije** Lječenje buhatosti (*Chenopodiidae* spp.) u pasa, mačaka i tvorova. Ljek sprječava razvoj jačaša (ovicidno djelovanje), lčnici i kukuljača (lavicidno djelovanje). Lječenje krpeljivosti (lodeci ricinus, *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus*) u pasa i mačaka. Eliminacija krpelja (lodeci ricinus) sa tvorova. Lječenje uljivosti u pasa (*Trichodectes canis*). Lječenje uljivosti u mačaka (*Felicola subrostratus*). Ljek se može koristiti u slučaju liječenja alergijskog dermatitisa uzrokovanih buhami prethodno dijagnosticiranog od veterinaru. **Ciljne životinjske vrste** Psi, mačke, tvorovi. **Kontraindikacije** Preparat ne smijete uporabiti na mlađunčadi mlađod od 8 tedana (VII) i mladim od 1 kg, jer o uporabi u toj dobi nema podataka. Ljek ne smijete uporabiti na tvorovima mlađim od 6 mjeseci. Ne koristite ga na bolesnim životinjama (trpi, sustavne bolesti, vratica) i životinjama tijekom operacija. Ne koristite na kunicima jer može doći do raspoloženja čak i sa smrtnim izhodom. Ne preporuča se uporaba proizvoda na nečlinskim životinjskim vrstama zbog nedostatka ispitivanja.

www.krka-farma.hr

 KRKA

Naša inovativnost i znanje
za djelotvorne i neškodljive
proizvode vrhunske kakvoće.

Samo za stručnu javnost.
Pazljivo pročitajte priloženu uputu prije uporabe lijeka.

KRKA-FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/1, 10000 Zagreb,
Telefon (01) 65 12 100. Telefona (01) 61 76 739
E-mail: info@krka.hr www.krka-farma.hr



- * Stalno ste prijavi?
- * Diza se začepila, a niste potrošili sprej!
- * Nepravilno sprejanje?
- * Curi !!!
- * Teško je pristupiti rani.

Don't worry – be happy!

Imamo rješenje !

Animedazon sprej (Klortetraciklin hidroklorid)

Aktivna tvar: Klortetraciklin hidroklorid...3,210 g

Ciljne vrste životinja: Goveda, svinje, ovce

Indikacije: Primjena kod površinskih ili operacionih rana kontaminiranih sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin. Može se koristiti i kao dio tretmana kod površinskih infekcija kože i papaka, posebno kod interdigitalnih infekcija kao što su infekcioni pododermatitis, interdigitalna flegmona i digitalni dermatitis uzrokovani sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin.

Način primjene i doze: Za primjenu na koži, dobro protresti prije primjene, držati na udaljenosti od 15-20 cm od mesta na koje primjenjujemo. sprejati 3 sek. dok tretirano mjesto ne poprimi jednaku boju. Kod infekcija papaka ponoviti nakon 30 sek.

Kod primjene na površinskim ranama dovoljna je jednokratna primjena.

Digitalni dermatitis - dvije primjene u razmaku od 30 sek., 1-2 puta na dan tijekom 3 dana. Kod drugih infekcija papaka, kao što su



CIJENA
48,53 kn
+ PDV



Centralna Veterinarska Agencija d.o.o.

Zagreb; Utinjska 40; R. Hrvatska

tel: 01/2304-334; -335; mob: 091/4655-112; -113

fax: 01/6604-031; mail: cva@cva.hr

www.cva.hr

CILJEVI I DJELOKRUG

Cilj je časopisa pružiti međunarodnu platformu za objavljivanje članaka u području veterinarskih i životinjskih znanosti i biotehnologije. Sadržaj časopisa posebno je posvećen veterinarskoj praksi, ali i svim znanstvenicima kao i sveučilišnim nastavnicima u cilju ohrabrenja da podijele svoje znanje i iskustvo na ovoj platformi. Rukopisi poslani u časopisu mogu uključivati: izvorne znanstvene radove, pregledne članke, kratka priopćenja, stručne članke, prikaze slučajeva i kongresna priopćenja te literarne zapise kao i osvrte novih knjiga na hrvatskom ili engleskom jeziku.

Tekstovi originalnih znanstvenih radova, preglednih članaka i stručnih rasprava mogu imati do 20 stranica (pisanih u MS Wordu, Times New Roman, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvatiće se i veći broj stranica. Kratka priopćenja i prikazi slučajeva do 7 stranica, a kongresna priopćenja, literarni zapisi i osvrte novih knjiga do 3 stranice.

Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:

- ako je jedan autor: Cvetnić (2015.).
- ako su dva autora: Džaja i Severin (2012.).
- ako su tri ili više autora: Dobranić i sur. (2008.); (Vince i sur., 2009.).

Uredništvo može zahtijevati od autora da popravi svoj rad bez da ga pošalje na istorazinsku recenziju ili ga može odmah odbiti.

Svaki originalni znanstveni rad, pregledni članak, stručna rasprava, kratko priopćenje i prikaz slučaja mora imati sažetak na engleskom jeziku, od najmanje 300-500 riječi, a ostali rukopisi moraju imati sažetak do najviše 300 riječi. Ključne riječi trebaju biti također napisane, minimalno 3-6.

Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft programima na računalu, a fotografije (analogne i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.

Popratno pismo autora mora sadržavati:

- Izjavu o sukobu interesa

Autori su dužni objaviti svaki potencijalni sukob interesa, kao što su konzultantske, finansijske uključenosti, vlasništvo patenta, itd. Autori originalnih znanstvenih članaka moraju u trenutku podnošenja objaviti finansijski aranžman koji imaju s tvrtkom čiji je proizvod istaknut u dostavljenom rukopisu, ili s tvrtkom s kojom izrađuju kompetitivni proizvod. Takve informacije će se povjerljivo čuvati sve dok je članak na recenziji i neće utjecati na uređivačku odluku, ali ako je članak prihvaćen za objavljivanje, takvi se podatci moraju priopćiti čitatelju.

- Izjavu o etičnosti

Autori moraju potvrditi da materijal dostavljen za objavljivanje nije objavljen niti posлан za objavljivanje nigdje drugdje osim, eventualno u obliku sažetka. Uredništvo neće dopustiti objavljivanje radova koji opisuju pokusne postupke na živim životinjama za

koje se može razumno prepostaviti da su im nanijeli nepotrebnu bol ili nelagodu. Kako bi za objavljivanje bili prihvatljivi, pokusi na živim kralješnjacima ili *Octopus vulgaris* trebaju biti u skladu s propisima Europske unije te su u skladu sa smjernicama koje je donio Odbor za istraživanje i etičkim pitanjima IASP. Uredništvo zahtjeva da svaki originalni znanstveni članak dostavljen časopisu uključuje izjavu da je za istraživanje dobiveno etičko odobrenje nadležne institucije ili izjavu da isto nije bilo potrebno.

Rukopisi se ne vraćaju.

Oglasavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu "Veterinarska stanica" mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.). U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.

U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u radu i to prema uputama koje se prilaže:

Knjiga: HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.

Poglavlje u knjizi: MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).

Dizertacija: FOLNOŽIĆ, I. (2014): Utjecaj tjelesne kondicije i pariteta na energetski, antioksidacijski i reproduksijski status visoko mlječnih krava tijekom prijelaznog razdoblja. Dizertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Zbornik referata: SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehniku" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).

Zbornik sažetaka: ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcincu bolesti Aujezskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

Časopis: CERUNDOLO, R. (2004): Generalized Microsporum canis dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. Vet. Dermatol. 15, 181-187.

Predaja rukopisa:

Rukopise na hrvatskom ili engleskom jeziku treba poslati elektroničkom poštom na adresu glavnog urednika na e-mail: smarko@gef.hr

U svakom članku treba navesti:

Dopisnog autora, njegov akademski stupanj, naziv i adresu organizacije u kojoj radi, broj telefona, telefaksa i elektroničku adresu (e-mail). Isto tako treba navesti akademski stupanj i organizaciju u kojoj rade svi ostali autori.

AIMS AND SCOPE

The goal of the journal is to provide an international platform for the publication of articles in the fields of veterinary and animal sciences, and biotechnology. The content of the journal is particularly dedicated to veterinary practitioners, but also to veterinary scientists and university professors, to encourage them to share their knowledge and experience on this platform. Manuscripts submitted to the journal may include: original scientific papers, review articles, short communications, professional articles, case reports, conference reports and literary records and reviews of new book either in Croatian or English languages.

Original research papers, review articles and expert discussions may have up to 20 pages (written in MS Word, Times New Roman, font size 12, spacing 1.5); however, in exceptional cases, a larger number of pages may be accepted. Case reports may be up to 7 pages and conference reports, literary records and reviews of new books may be up to 3 pages.

In the text, references should be cited as follows:

- a) single author: Cvetnić (2015)
- b) two authors: Džaja and Severin (2012)
- c) three or more authors: Dobranić et al. (2008); (Vince et al., 2009).

The Editorial Board may require authors to improve their work without submitting it to the peer review process or may immediately reject it.

Original scientific papers, review articles, and expert discussions must have an abstract in English between minimum 300 to 500 words, while other papers must have an abstract of up to 300 words. A minimum of 3 – 6 keywords should also be provided.

All figures should be prepared using Microsoft programs, and photos (analogue and digital) should be of such quality that allows for successfully reproduction.

The Covering letter authors must include:

- a) Conflict of interest statement

Authors are required to disclose any potential conflict of interest such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. Authors of research articles must disclose at the time of submission any financial arrangement they have with the company whose product features prominently in the submitted manuscript, or with a company making a competing product. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will not influence the editorial decision, but if the article is accepted for publication, such information must be communicated to the reader.

- b) Ethical statement

The authors must certify that the material submitted for publication has not been published except in abstract form, and is not being considered for publication elsewhere. The Editorial Boards will not allow the publication of papers describing

experimental procedures on living animals which may reasonably be presumed to have inflicted unnecessary pain or discomfort upon them. To be acceptable for publication, experiments on living vertebrates or *Octopus vulgaris* should conform to the European Union's legislation and are in accordance with guidelines set by the Committee for Research and Ethical Issues of IASP. We require every research article submitted to the Journal to include a statement that the study obtained ethics approval or a statement that it was not required.

Manuscripts will not be returned.

Advertising of veterinary medicinal products in the journal Veterinarska Stanica must be in accordance with Articles 75-78 of the Act on Veterinary Medicinal Products (Official Gazette 84/2008) and the Ordinance on the advertising of veterinary medicinal products (Official Gazette 146/2009). For veterinary medicinal products that have not been granted marketing authorisation, advertisers are required to request consent for advertising from the competent authority.

The literature citations may list only the papers cited in the manuscript and according to the instructions below:

Book: HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.

Book chapter: MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).

Dissertation: FOLNOŽIĆ, I. (2014): Effect of body condition and parity on energetic, antioxidative and reproductive status in high yielding dairy cows during transition period. Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb.

Proceedings manuscripts: SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).

Proceeding abstracts: ČAJAVEC, S., Lj. MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcincu bolesti Aujeszkoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

Journal: CERUNDOLLO, R. (2004): Generalized Microsporum canis dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. Vet. Dermatol. 15, 181-187.

Manuscripts submission:

Manuscripts should be submitted either in Croatian or English languages by electronic mail to the chief editor via e-mail: smarko@vrf.hr

All submissions should include:

Academic degree, Affiliation, Phone number, Fax number and e-mail of Corresponding author. It should also specify the Academic degree and Affiliation for all other authors.