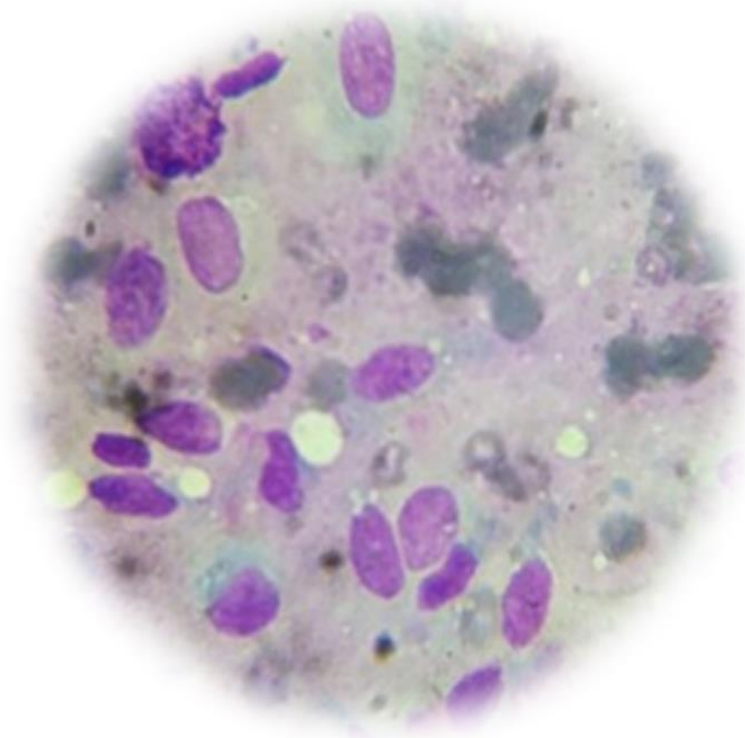




VETERINARSKI PREGLED



NAUČNI ČASOPIS
DEPARTMANA ZA VETERINARSKU MEDICINU



VETERINARY REVIEW



SCIENTIFIC JOURNAL OF THE
DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE

VETERINARSKI PREGLED

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

Glavni i odgovorni urednik: Prof. dr Aleksandar Potkonjak

Zamenici urednika: Prof. dr Ivan Stančić i Prof. dr Mihajlo Erdeljan

Tehnički urednici: Doc. dr Zoran Ružić i Doc. dr Ivan Galić

Sekretar: Dr vet. Tijana Kukurić, asist.

Uređivački odbor:

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

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

Izdavački savet:

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

Predmet časopisa: Časopis objavljuje naučne i stručne radove iz oblasti veterinarske medicine i srodnih disciplina.

Jezik radova: Srpski (sa engleskim apstraktom) ili Engleski (sa srpskim sažetkom) po želji autora.

Periodičnost: Jedna sveska godišnje

Vrste radova: Originalni radovi, Pregledni radovi, Meta-analize, Radovi iz istorije veterinarske medicine, Radovi iz oblasti veterinarskog obrazovanja, Prikaz slučaja, Prikaz tehničkih rešenja, Prikazi knjiga, Naučna kritika, Pisma uredništvu, Izveštaji sa seminara i drugih stručnih događaja.

Format: Časopis izlazi u štampanoj/elektronskoj formi i biće publikovan na sajtu Departmana za veterinarsku medicinu

Prijava radova na mejl: vetpregled@gmail.com

DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU
Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu



Vivat Medicina Veterinaria Universitatis Studiorum Neoplantensis

VETERINARY REVIEW

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

Editor-in-Chief: Prof. dr Aleksandar Potkonjak

Deputy Editors: Prof. dr Ivan Stančić and Prof. dr Mihajlo Erdeljan

Technical Editors: Doc. dr Zoran Ružić and Doc. dr Ivan Galić

Secretary: Dr vet. Tijana Kukurić, asist.

Editorial Board:

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

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

Council:

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

Subject of the Journal: The Journal publishes scientific and professional papers in the field of veterinary medicine and related disciplines.

Language: Serbian (with English abstract) or English (with Serbian abstract).

Periodicity: One No per year

Papers: original papers, review articles, meta – analysis, papers from the history of veterinary medicine, papers in the field of veterinary education, case report, technical solutions, book, scientific polemic, letters to the Editor, reports from seminars and other professional events.

For m at: The journal is published in printed and electronic form and will be published on the website of the Department of Veterinary Medicine.

Manuscript submission: vetpregled@gmail.com

DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE
Faculty of Agriculture University of Novi Sad



Vivat Medicina Veterinaria Universitatis Studiorum Neoplantensis

Sadržaj

CITOPATOLOŠKI NALAZ NEOPLAZIJE MLEČNE ŽLEZDE KUJA <i>CYTOPATHOLOGICAL FINDINGS NEOPLASM OF THE MAMMARY GLANDS IN BITCHES</i> Ivana Davidov, Annamaria Galfi Vukomanović, Jelena Aleksić Radojković, Tijana Kukurić.....9	
DIURNALNA VARIJACIJA TEMPERATURE POVRŠINE TELA KOD KRAVA U LETNJIM MESECIMA <i>DIURNAL VARIATION OF BODY SURFACE TEMPERATURE OF DAIRY COWS DURING SUMMER</i> Mira Majkić, Marko Cincović, Jovan Spasojević, Bojan Blond, Jovan Stanojević.....15	
PRAKTIČNE SMERNICE ZA PRAVILNU IZRADU KRVNIH RAZMAZA – PREGLEDNI RAD <i>PRACTICAL GUIDELINES FOR THE PROPER PREPARATION OF BLOOD SMEARS - A REVIEW PAPER</i> Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Slobodan Stojanović, Dragoljub Marić, Zorana Kovačević, Srđan Todorović, Milenko Rikić, Slobodan Knežević, Suzana Vidaković Knežević, Dušan Lazić.....25	
UPOTREBA TERMOGRAFIJE U DIJAGNOSTICI ARTRITISA KOD GOVEDA – PRIKAZ SLUČAJA <i>THE USE OF THERMOGRAPHY IN DIAGNOSTICS OF ARTHRITIS IN CATTLE - CASE REPORT</i> Jovan Spasojević, Mira Majkić, Marko Cincović, Jovan Stanojević, Ivan Galić, Bojan Toholj...32	
UTICAJ RAZLICITIH RASA NERASTOVA NA KVALITETE EJAKULATA <i>THE INFLUENCE OF BOAR BREED ON EJACULATE QUALITY</i> Igor Zdraveski, Petar Dodovski, Pance Dameski, Natasa Pejcinovska, Nikola Karabolovski, Talija Hristovska, Mimi Ristevski..... 38	

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

CITOPATOLOŠKI NALAZ NEOPLAZIJE MLEČNE ŽLEZDE KUJA *CYTOPATHOLOGICAL FINDINGS NEOPLASM OF THE MAMMARY GLANDS* *IN BITCHES*

Ivana Davidov^{a*}, Annamaria Galfi Vukomanović^a, Jelena Aleksić Radojković^b, Tijana Kukurić^a

^a*Department za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

^b*Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd*

^a*Department of veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

^b*Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Belgrade*

**Autor za kontakt: ivana.davidov@polj.edu.rs*

SAŽETAK

Neoplazije mlečnih žlezda kuja su hormonski zavisne, a rizik od njihovog nastajanja se povećava nakon svakog estrusnog ciklusa. Čelije neoplazije mlečne žlezde, bilo benigne ili maligne, imaju receptore za estrogen i progesteron. Cilj ovog istraživanja je da se uoče citopatološke promene kod kuja s neoplazijom mlečne žlezde. Postavljanje tačne i precizne dijagnoze ima za cilj da se u velikom procentu spasi život obolele kuje. Na kliničkom pregledu 50 kuja u okviru ovog istraživanja, utvrđeno je postojanje kvržica u predelu mlečnih žlezda, veličine od 1.5 do 3 cm. Na osnovu citološke analize promenjenih mlečnih žlezda kuja, 84% mlečnih žlezda je s malignim promenama i 16% s benignim promenama. Zbog velikog procenta maligniteta neoplazija mlečnih žlezda kuja, preporuka je da treba uvesti rutinske preglede kuja starijih od 5 godina makar jednom godišnje.

Ključne reči: citopatologija, neoplazija, mlečna žlezda

ABSTRACT

Neoplasms of the mammary glands in bitches are hormonally dependent, and the risk of their formation increases after each estrous cycle. Neoplasm cells of the mammary gland, whether benign or malignant, have receptors for estrogen and progesterone. The aim of this research is to observe cytopathological changes in bitches with mammary gland neoplasia. Establishing an accurate and precise diagnosis is to save the life of a sick bitch in a large percentage. During the clinical examination of 50 bitches in this research, the existence of lumps in the region of the mammary glands were determined, ranging in size from 1.5 to 3 cm. Based on the cytological analysis of the changed mammary glands of bitches, 84% of the mammary glands have malignant changes and 16% have benign changes. Due to the high percentage of malignancy of mammary gland neoplasia in bitches, it is recommended that bitches older than 5 years should be routinely examined at least once a year.

Key words: cytopathology, neoplasia, mammary gland

UVOD

Neoplasia ili u narodu poznato kao rak ili tumor, je bolest genoma koja nastaje kao posledica alteracija DNK, što dovodi do disregulacija strukture gena ili njegove disfunkcije (1,2). Oštećenje ćelijskog genoma ili alteracija ekspresije gena su uobičajne pojave vezane za sve neoplazije (3). S obzirom na to da su ovo nasledene greške u replikaciji DNK, svi višćelijski organizmi suočavaju se vekovima s razvojem neoplazija. Mnoge mutacije mogu biti bez posledica, ali se neoplazija može razviti kada se neletalne mutacije dešavaju u malom podskupu kodirajućih i nekodirajućih regiona genoma (4). Postoje mnogi agensi kao što su: virusi, hemijske materije, zračenje i dr., koji narušavaju pravilnu replikaciju DNK i koji pokreću formiranje neoplazija.

Mutacije DNK sekvence nisu jedini put do neoplazije (5). Epigenetski mehanizmi regulišu ekspresiju gena bez izazivanja strukturnih promena u genomu i igraju ulogu u malignoj transformaciji. Epigenetske promene su reverzibilne, nasledne promene ekspresije gena bez mutacije genoma. Tri glavne forme epigenetske regulacije gena podrazumevaju: metilaciju DNK, acetilaciju histona i ekspresiju mikroRNK-a (6).

Neoplazije mlečnih žlezda kuja su hormonski zavisne, a rizik od njihove pojave se povećava nakon svakog estrusnog ciklusa. Čelije

neoplazije mlečne žlezde, bilo benigne ili maligne, imaju receptore za estrogen i progesteron. Ovi hormoni indukuju hipertrofiju parenhima mlečne žlezde, što je očigledno nakon estrusa (7, 8). Veća incidencija neoplazija u zadnjim mamarnim kompleksima je u korelaciji sa većom zapreminom žlezde i obilnom sekrecijom tokom perioda laktacije. Ako je pre prvog ciklusa rizik od pojave neoplazije 0,5%, posle prvog ciklusa dostiže 8%, a posle drugog ili više estrusnih ciklusa preko 26%. Kod pasa, oko 40% svih neoplazija mlečne žlezde je u ingvinalnim mlečnim žlezdama i pojavljuju se ubrzo nakon estrusa. Incidenca različitih histoloških oblika može biti sledeća: benigne neoplazije 51%, od kojih su 45,5% fibroadenomi, 5% adenomi i 0,5% benigni mezenhimalni tumori; karcinomi 45,5%, od čega solidni karcinomi 16,9%, tubularni adenokarcinomi 15,4%, papilarni adenokarcinomi 8,6% i anaplastični karcinomi 4,0%; sarkomi i maligni mešoviti tumori 3,5% (7).

Citopatološki pregled neoplazija se izvodi posmatranjem manje količine promenjenih ćelija na obojenom razmazu, pod mikroskopom. Citopatologija predstavlja inicijalni dijagnostički metod za utvrđivanje vrste promenjenih ćelija i klasifikaciju neoplastične promene. Prednosti citologije su višestruke: brza je, minimalno invazivna, ne zahteva anesteziju, manja je mogućnost krvarenja i komplikacija i jeftina je. Citopatologija ima ograničenja, posebno ukoliko su neoplastične ćelije zahvaćene i inflamacijom i nekrozom (9). Citopatologija može da ukaže na

postojanje promene i definiciju iste ali ne može da odredi stepen i često ne može da konačnu dijagnozu. Ova metoda se ne preporučuje kod kavernoznih lezija, posebno kada su u pitanju neki unutrašnji organi poput jetre i slezine. Za diferencijaciju adenoma i adenokarcinoma mlečne žlezde citopatologija ne može da da definitivnu dijagnozu i prognozu iz razloga što su ove neoplazije često imaju zajedno i benigne i maligne neoplastične ćelije (10).

Cilj ovog istraživanja je da se uoče citopatološke promene kod kuja s neoplazijom mlečne žlezde. Postavljanje tačne i precizne dijagnoze ima za cilj da se u velikom procentu spasi život obolele kuje. Pored klasičnih metoda dijagnostike neoplazija mlečne žlezde, citopatologija predstavlja inicijalni dijagnostički metod za utvrđivanje vrste promenjenih ćelija i klasifikaciju neoplazija. Podaci koji će se dobiti u okviru ovog istraživanja bili bi pokazatelji brze i efikasne citopatološke dijagnoze neoplazija mlečne žlezde, što ima za cilj sprečavanje razvoja i napredovanja neoplazija, koje mogu imati loš ishod za kuju.

MATERIJAL I METOD

U periodu 2023. godine u veterinarskoj ambulanti na teritoriji grada Novog Sada je pregledano 50 kuja s neoplastičnim promenama na mlečnoj žlezdi. Sve kuje, koje su uključene u ovo istraživanje bile su stare od 8 do 11 godina.

Pored anamnestičkih podataka životinja i biohemijske analize krvi, beležilo se prisustvo metastaza primenom RTG toraksa.

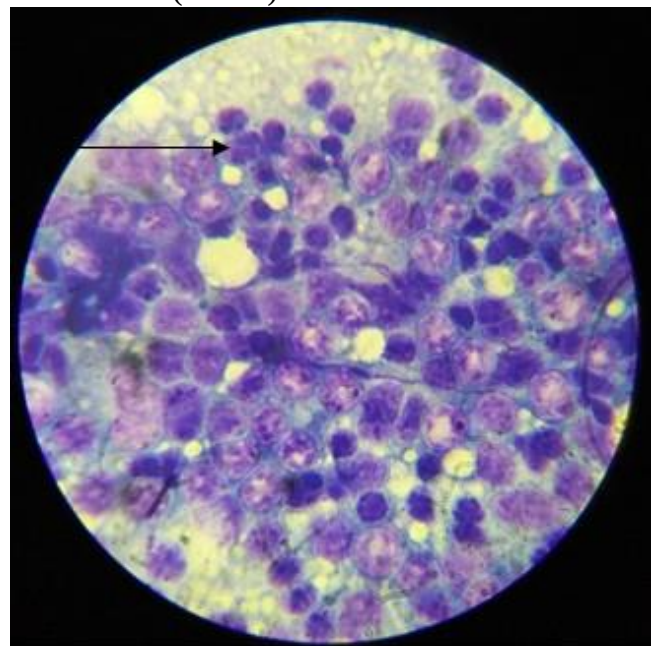
Uzorci mlečne žlezde su dobijeni nakon hirurške ekscizije mlečne žlezde. Iz uzoraka su uzimani materijali za citopatološku analizu u vidu FNA (eng. fine needle aspiration) i otisak preparata. Citopatološka analiza je rađena za svaku neoplaziju svake životinje. Za FNA metodu je korišćena igla promera 21- gauge, koja je bila pričvršćena za špric od 10 ml. Uzet materijal koji se nalazio u igli šprica je prenet na mikroskopsku pločicu i obojen Diff-Quick metodom. Od neoplastičnih promena mlečne žlezde koje je bilo teško preseći, pravljene su otisak preparati. Izvađeno promenjeno tkivo mlečne žlezde je nakon ekscizije stavljeno na sterilnu gazu, zatim je presečeno na pola.

Presečena polovina je nežno pritiskana na čistom belom papirnatom ubrusu, radi odstranjivanja krvi s tkiva i radi pravljenja otisak preparat. Napravljeni otisak preparati su sušeni i bojeni Diff-Quick metodom. Obojeni preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Leica) sa imerzijom, pri čemu se prvo određivala debljina razmaza, obojenost preparata i uočljivost morfolologije ćelije. Preparati koji nisu zadovoljavali ove kriterijume bili su isključeni. Za postavljanje citološke dijagnoze koristili su se parametri po primeru rada autora (11, 12).

Sve patomorfološke promene su fotografisane i svi dobijeni rezultati su obrađeni standardnim statističkim metodama primenom programa Microsoft Office Excel.

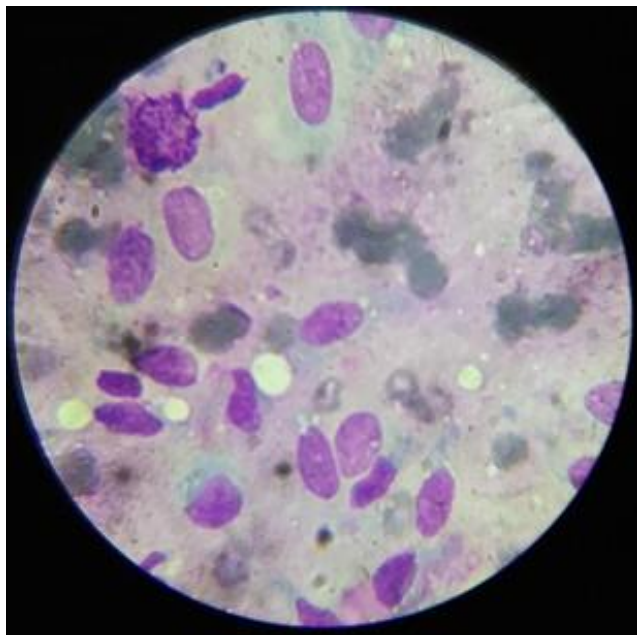
REZULTATI

Na kliničkom pregledu svih 50 kuja, utvrđeno je postojanje kvržica u predelu mlečnih žlezda, veličine od 1.5 do 3 cm. Na osnovu analize dobijenih citoloških preparata uočljivi su klasteri neoplastičnih ćelija koje imaju glatku intaktnu ćelijsku membranu. Unutar ćelije se nalaze grudvice hromatina i jedarce koje je slabo vidljivo ili se ne vidi (slika 1).



Slika 1. Citopatološki nalaz: Otisak preparata neoplastičnog tkiva mlečne žlezde kuja sa uočljivim klasterima (strelica), Diff-Quick, 100x

Na preparatu dobijenim FNA metodom uzimanja uzoraka (slika 2), nakon bojenja Diff-Quick-om, vidljive su pleomorfne ćelije s neregularnom marginom jedra i granulisanim hromatinom.



Slika 2. Citopatološki nalaz FNA neoplastičnog tkiva mlečne žlezde kuja sa uočljivom neregularnom jedrovom marginom, Diff-Quick, 100x

Na osnovu citološke analize 50 promenjenih mlečnih žlezda kuja, 42 (84%) mlečnih žlezda je s malignim promenama i 8 (16%) s benignim promenama. Analizom kompletne krvne slike kuja s neoplazijama mlečne žlezde (tabela 1), uočilo se variranje u vrednostima leukocita (WBC), hemoglobina (HGB) i prosečanog volumena trombocita (MPV).

Tabela 1. Raspon vrednosti kompletne krvne slike kuja s neoplazijom mlečne žlezde

	Izmerene vrednosti	Referentne vrednosti
WBC	7.58-31.82	$5.05-16.76 \times 10^9/L$
RBC	5.24-7.6	$5.65-8.87 \times 10^{12}/L$
HGB	11.8-22.3	13.1-20.5 g/dl
HCT	31.9-48.9	37.3-61.7%
MCV	60.9-64.5	61.6-73.5 fL
MCH	22.3-22.5	21.2-25.9 pg
MCHC	34.6-37	32-37.9 g/dl
PLT	384-390	$148-484 \times 10^9/L$
RDW	14.9-18.1	13.6-21.7 %
PCT	0.17-0.53	0.14-0.46 %
MPV	4.4-13.9	8.7-13.2 fL

Analizom biohemijskih parametara krvi kod kuja s neoplazijama mlečne žlezde (tabela 2), uočilo se variranje u vrednostima globulina (GLOB) dok ostali parametri ne pokazuju odstupanja od fizioloških vrednosti.

Tabela 2. Raspon biohemijski vrednosti krvi kuja s neoplazijom mlečne žlezde

	Izmerene vrednosti	Referentne vrednosti
ALB	25-35	26-46 g/L
TP	60-87	52-82 g/L
GLU	4.6-6.1	3.3-6.1 mmol/L
ALP	81-113	0-212 U/L
ALT	27-38	0-88 U/L
BUN	3.8-5.6	2.1-9.3 mmol/L
CREA	46-70	35-141 $\mu\text{mol}/L$
GLOB	25-62	22-46 g/L

Na rendgenskim snimcima toraksa kuja s neoplazijom, 92.86% (39/42) je bilo bez vidljivih promena na plućima i srcu. Na rendgenskom snimku (slika 3) se jasno ocrta plućni crtež bez znakova konsolidacije plućnog parenhima. Srčana senka je uredna.



Slika 3. Na rendgenskom snimku u LL projekciji nisu očljive promene na plućima i srcu kuja s neoplazijom mlečne žlezde.

DISKUSIJA

Mlečna žlezda pasa je najčešće mesto za razvoj različitih neoplastičnih i ne-neoplastičnih bolesti kao što su neoplazije, mastitis, steatitis, galaktostaza, galaktoreja, agalaktija itd. Pretpostavlja se da inflamatorne i neproliferativne bolesti mlečne žlezde ne povećavaju rizik od neoplazije (13). Međutim, proliferativne bolesti mlečne žlezde sa ili bez atipije predstavljaju blagi i umereni rizik, dok je karcinom *in situ* povezan sa značajnim rizikom po život ako se ne leče. Karcinomi često imaju lošu prognozu zbog visoke stope lokalnog recidiva, kao i metastaza, što zahteva operaciju u nekim slučajevima kao pomoćno sredstvo za hemioterapiju (14). Neoplazije mlečne žlezde pasa predstavljaju 25 do 50 procenata svih neoplazija pasa (4-6) i tek su na drugom mestu posle neoplazija kože. S obzirom na stopu pojavljivanja neoplazije mlečne žlezde se razlikuju među vrstama. Tako je karcinom mlečne žlezde najčešći kod žena (32%) i kuja (52%) i zauzima treće mesto po učestalosti neoplazije (17%) posle limfohemopoetskih i kožnih neoplazija. Imajući u vidu visoku stopu pojavljivanja, brz početak rasta i lošu statistiku preživljavanja pacijenata, brza i rana dijagnoza neoplazije mlečne žlezde je potrebna (15).

Aspiracija finom iglom (FNA) je biopsija u kojoj se tkivo i uzorci tečnosti uzimaju iz čvrstih ili cističnih lezija pomoću sićušne igle. To je jedna od nekoliko tehnika koje se koriste za otkrivanje da li su kvržice prisutne u mlečnoj žlezdi neoplazije ili ne. Dakle, ova tehnika bi mogla da otkrije neoplazije mlečne žlezde pasa na osnovu citologije poznate kao citologija aspiracije finom iglom (FNAC). FNAC se obično koristi za ranu dijagnozu neoplazije kod ljudi, a takođe i kod pasa za diferenciranje lezija mlečne žlezde i korelaciju njihovog odnosa s histološkim stepenom neoplazije (16). U animalnoj i humanoj medicini FNA se smatra jeftinom, brзом, jednostavnom, relativno neinvazivom metodom za prikupljanje uzoraka za citološku procenu površinskih i radiografski uočljivih lezija. Uprkos gore navedenim prednostima, dva najčešća uobičajena nedostatka ove tehnike uključuju odsustvo arhitekture tkiva i poteškoće u dobijanju materijala. Prisustvo veće mase tkiva ili veće proliferativne promene kao odgovor na estrogen u većini kaudalnih žlezda se smatra da je razlog

visoke pojave neoplastičnih promena mlečne žlezde u ingvinalnoj regiji. Mada, najčešći razvoj neoplazija mlečne žlezde kuja je na kaudalnim mamarnim kompleksima (17), što odgovara nalazima dobijenim u ovom istraživanju. Isti autori (17) su dijagnostikovali 9.2% benignih neoplazija mlečne žlezde i 78.5% malignih neoplazija. U okviru ovog istraživanja dobijeni su nešto veći procenati benignih neoplazija (16%) i malignih neoplazija (84%).

U toku ovog istraživanja je utvrđeno pet citoloških kriterijuma za dijagnostiku maligniteta. Nepravilan odnosno atipičan izgled hromatina bio je najznačajniji kriterijum maligniteta. Abnormalnosti u nukleolusima je takođe bio značajan kriterijum za procenu maligniteta. Varijacije u nukleusnoj veličini su primećene u i benignim i u malignim neoplazijama, ali su ipak bile češće u malignim. Abnormalne mitotičke figure su uvrštene kao indikatori karcinoma dojke kod ljudi (18). Dok su one utvrđene samo u malignim neoplazijama u ovom istraživanju, ali njihova retka pojava nije uzeta kao važan kriterijum. Takođe, i stepen celularnosti nije bio dobar kriterijum za razlikovanje benignih od malignih neoplazija u ovom istraživanju.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja može se zaključiti da je citopatologija minimalno invazivna i jeftina metoda, kojom se može utvrditi i razlikovati neoplazija od ostalih promena kao što su hiperplazija ili inflamacija. Preporuka je uvođenje rutinskih pregleda kuja starijih od 5 godina makar jednom godišnje pri čemu je veoma važna uloga veterinara u edukaciji vlasnika pasa o svim rizicima, preventivnim merama i posledicama neoplazija mlečne žlezde kuja.

1. Garraway L.A., Lander E.S. (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell*, 153: 17–37.
2. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Bianki A.V., Bignell G.R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500: 415–21.
3. Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D. (2010). Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 220–8.
4. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546–58.
5. Timp W., Feinberg A.P. (2013). Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer*, 13: 497–510.
6. You J.S., Jones P.A. (2012). Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*, 22: 9–20.
7. Burrai G.P., Baldassarre V., Brunetti B., Iussich S., Maniscalco L., Mariotti F., Sfacteria A. (2022). Canine and feline in situ mammary carcinoma: A comparative review. *Vet Pathol*, 59(6): 894–902.
8. Allen S.W., Mahaffey E.A. (1989). Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. *J Am Anim Hos Ass*, 25(5): 540–6.
9. Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Lieberman P.H., Johnson G.F. (1981). Canine hepatocellular carcinoma. *Vet Pathol*, 18(4): 427–38.
10. Klopffleisch R. (2016). *Veterinary oncology a short textbook* (1st ed.), Springer International Publishing.
11. Dolka I., Czopowicz M., Gruk-Jurka A., Wojtkowska A., Sapierzyński R., Jurka P. (2018). Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. *PLOS ONE*, 13(1): e0191595.
12. Robinson I.A., McKee G., Nicholson A., D'Arcy J., Jackson P.A., Cook M.G., Kissin M.W. (1994). Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. *Lancet*, 343(8903): 947–9.
13. Shrestha A., Chalise S., Karki S., Shakya G. (2011). Fine needle aspiration cytology in a palpable breast lesion. *Journal of Pathology of Nepal*, 1: 131–5.
14. Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of Veterinary Medical Association Physiology Pathology Clinical Medicine*, 48: 85–96.
15. Macewen E.G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Review*, 9(2): 125–36.
16. Basra K., Choudhary R.K. (2022). Canine mammary tumour fine needle aspirate cytology and identification of tumours type. *Acta Scientific Veterinary Science*, 4(6):102–7.
17. Sontas B.H., Öztürk G.Y., Toydemir T.F.S., Arun S.S., Ekici H. (2012). Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Domest Anim*, 47(1): 125–30.
18. Yildirim F., Gurel A. (2012). Comparison between cytological and histopathological evaluation of canine mammary tumours. *Revue Med Vet*, 163(3): 116–22.

DIURNALNA VARIJACIJA TEMPERATURE POVRŠINE TELA KOD KRAVA U LETNjim MESECIMA *DIURNAL VARIATION OF BODY SURFACE TEMPERATURE OF DAIRY COWS DURING SUMMER*

Mira Majkić^{a*}, Marko Cincović^a, Jovan Spasojević^a, Bojan Blond^a, Jovan Stanojević^a

^aDepartman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

^aDepartment of veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

*Autor za kontakt: miramajkic@gmail.com

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je da se ispita diurnalna varijacija distribucija frekvencije i prosečne vrednosti temperature površine tela koje su izmerene infracrvenom termovizijskom kamerom kod krava tokom stresnog i termoneutralnog dela dana u letnjim mesecima. U ogled je uključeno 30 krava Holštajn-frizijske rase u laktaciji. Merenje telesne temperature vršeno je pomoću neinvazivne infracrvene termovizijske kamere. Snimanje je vršeno lateralno sa približno iste udaljenosti od životinje od oko 2m. Jedan snimak je napravljen tokom najtoplijeg dela dana (THI >72), a drugi snimak tokom termoneutralnog perioda dana (THI <72). Raspon temperatura koji je izmeren na površini tela kod krava u termoneutralnom periodu bio je od 22-38°C, dok je u toplotnom stresu bio od 36-39,5°C. Postojale su značajne razlike u srednjim vrednostima temperatura različitih delova tela u termoneutralnom periodu i toplotnom stresu i to za: celo telo 29,6:38°C (p<0,0001); vime 32,6:38,5°C (p<0,0001); regija glave 31:37,6°C (p<0,0001); prednji ekstremiteti 28,3:36,9°C (p<0,0001); zadnji ekstremiteti 27,6:37,4°C (p<0,0001); dorzolateralni deo abdomena 29,5:38,4°C (p<0,0001) i ventrolateralni deo abdomena 29,9:37,8°C (p<0,0001). Kada se posmatra oblik distribucija frekvencija za temperaturu tela vidimo da je distribucija za celo telo normalna i simetrična u termoneutralnom periodu, dok je blaga asimetrija udesno sa određenim istaknutim najtoplijim tačkama prikazana kod toplotnog stresa. Diurnalno variranje temperature površine tela u termoneutralnom i stresnom periodu dana kod krava na farmama je statistički značajno, tako da su distribucije temperatura i srednje vrednosti za pojedine regije više u najtoplijem delu dana. Dobijeni podaci ukazuju da je neophodno da se kontinuirano tokom dana beleže telesne temperature krava kako bi se procenila stresna opterećenost. Pored navedenog u obzir se moraju uzeti izmerene srednje temperature ali i karakteristike distribucija frekvencije temperature za određenu regiju kako bi tumačenje termalne opterećenosti bilo potpuno.

Ključne reči: temperature površine tela, termogram, temperature regije tela, toplotni stress, krave

ABSTRACT

The aim of this study is to examine diurnal variation of frequency distribution and average body surface temperature values measured by an infrared thermal imaging camera in cows during heat stress and thermoneutral period of summer's day. 30 lactating Holstein-Friesian cows were included in the experiment. Body temperature was measured using a non-invasive infrared thermal imaging camera. The recording was done laterally from approximately the same distance from the animal, about 2m. One recording was taken during the hottest part of the day (THI >72), and the other recording was taken during the thermoneutral period of the day (THI <72). The range of temperatures measured on the body surface of cows in the thermoneutral period was 22-38°C, while in heat stress it was 36-39.5°C. There were significant differences in the mean values of temperatures of different parts of the body in the thermoneutral period and heat stress: whole body 29.6:38°C ($p<0.0001$); udder 32.6:38.5°C ($p<0.0001$); head region 31:37.6°C ($p<0.0001$); front extremities 28.3:36.9°C ($p<0.0001$); hind limbs 27.6:37.4°C ($p<0.0001$); dorsal-lateral part of abdomen 29.5:38.4°C ($p<0.0001$) and ventral-lateral part of abdomen 29.9:37.8°C ($p<0.0001$). When observing the shape of frequency distributions for body temperature, we see that the distribution for the whole body is normal and symmetrical in the thermoneutral period, while a slight asymmetry to the right with certain prominent hottest spots is shown in heat stress. The diurnal variation of the body surface temperature in the thermoneutral and stressful period of the day in cows on farms is statistically significant different, so that the temperature range and the mean temperatures were higher in the hottest part of the day. The obtained data indicate that it is necessary to continuously record the body temperatures of cows during the day in order to assess the stress load. In addition to the above, the measured mean temperatures must be taken into account, as well as the characteristics of the temperature frequency distributions for a certain region in order for the interpretation of the thermal load to be complete

Key words: body surface temperature, thermogram, body region temperature, heat stress, cows

UVOD

Zbog globalnog zagrevanja i porasta svetskog proseka temperature, postoje značajna odstupanja temperature u velikom broju geografskih regija, pa tako i u našoj. Indeks temperature i vlažnosti vazduha je sve nepovoljniji, pa krave iz termoneutralne zone ulaze u zonu toplotnog stresa (1). Toplotni stres je stanje u kom jedinke izložene visokim ambijentalnim temperaturama troše velike količine energije za podhlađivanje, umanjujući pri tome sopstvenu energiju za proizvodnju i održavanje zdravlja, a promene nastaju na svim nivoima uključujući i celularne adaptacije (2,3). THI indeks izmeren na teritoriji Vojvodine u proteklih 15 godina neminovno pokazuje da je

toplotni stres sve intenzivniji i njegovo trajanje je sve duže tokom godine (4,5). Krave su posebno osetljiva kategorija zbog visoke proizvodnje mleka koja je podržana preusmeravanjem energije na vime, a svaki nedostatak energije i hranljivih materija može dovesti do različitih produktivnih bolesti (6-10).

Preživari se rashlađuju odavanjem temperature sa površine tela, što korelira sa metaboličkim izmenama u telu i THI indeksom sredine, pa temperature tela čini pogodnom za procenu toplotne opterećenosti (11). Ukupna energija zračenja koju neko telo emituje ili apsorbira zavisi od energije koju telo odaje. Da bi se odredila temperatura koju telo emituje mora se znati stepen emisivnosti merne površine. Telo čija je površinska temperatura veća od apsolutne nule uopšte ne emituje energiju talasne dužine

elektromagnetnog spektra. Najveći deo energije koju tela emituju zračenjem ima talasnu dužinu 7–14 μm , i naziva se infracrveno (IR) zračenje. Kod životinja je 40–60% gubitka toplote unutar ovog opsega, a procena temperature koje telo emituje radijacijom obično se vrši preko merenja intenziteta zračenja. Izvor zračenja je površina tela, tj. izmerene vrednosti opisuju pre svega temperaturu površine kože životinje. Uređaji koji mere temperature određene površine, baziraju se na emisiji infracrvenog zračenja i formiranja slike (12). Termovizijska kamera je uređaj za bezkontaktno snimanje emisije toplote, odnosno infracrvenog zračenja, pa se naziva infracrvena kamera. Rezultat snimanja termovizijskom kamerom je fotografija–termogram. Termogram se odlikuje paletom boja od žute i crvene koje ukazuju na toplija mesta do plave i ljubičaste, koje ukazuju na hladnija mesta. Svaki termogram je slika za sebe i uz svaki termogram mora postojati paleta boja, koja predstavlja rezultat određenog merenja. Termovizijska kamera meri emisiju toplote preko tzv. kadmijumskih detektora. Ovi detektori su napravljeni od kadmijum mercuri telurida i imaju mogućnost da skupljaju kvante-određene količine toplotne energije. Toplotna energija poseduje električnu otpornost koja se menja kada detektor primi kvant toplote. Nastale promene preko sabirača i izmenjivača daju termogram (13). Termografska oprema nalazi sve veću primenu i u veterini, pošto je infracrvena termografija neinvazivna bezbedna metoda. U veterinarskoj medicini infracrvena termografija (IRT) se koristi prvenstveno u dijagnostičke svrhe, ali i za procenu dobrobiti životinja. Prvi radovi objavljeni su pre gotovo četiri decenije (14) gde su autori procenili efikasnost infracrvenog skeniranja kao tehnike za otkrivanje estrusa i zaključili da infracrvena kamera može poslužiti kao dodatni dijagnostički metod. Takođe, infracrvena kamera može poslužiti i za ranu dijagnostiku mastitisa (15). Međutim, upotreba termovizijske kamere ima i odgovarajuća ograničenja. Glavna ograničenja u upotrebi termovizijske kamere se odnose na to da termogrami moraju biti napravljeni bez direktnog delovanja sunčevog zračenja, kao i da površina dlačnog pokrivača, kod goveda mora biti čista i bez prisustva stranih materijala (omče, lanci i sl.). Slike IRT-a mogu ukazivati na promene

temperature određenih delova tela nastale kao posledica vazodilatacije i lokalnog povećanja protoka krvi, što rezultira povećanjem temperature kože nastale kao posledica delovanja visokih temperatura. Svaku termalnu sliku određene površine treba posebno obraditi i odrediti distribuciju frekvence temperatura (odrediti minimalne, maksimalne i prosečne temperature) korišćenjem adekvatnog softvera. Međutim, promene u maksimalnom IRT površine tela su bolje povezane sa promenama unutrašnje telesne temperature i fiziološkim odgovorima na stres, kao i promenama u laktaciji i metabolizmu.

Cilj ovog istraživanja je da se ispita diurnalna varijacija distribucija frekvencije i prosečne vrednosti temperature površine tela koje su izmerene infracrvenom termovizijskom kamerom kod krava tokom stresnog i termoneutralnog dela dana u letnjim mesecima.

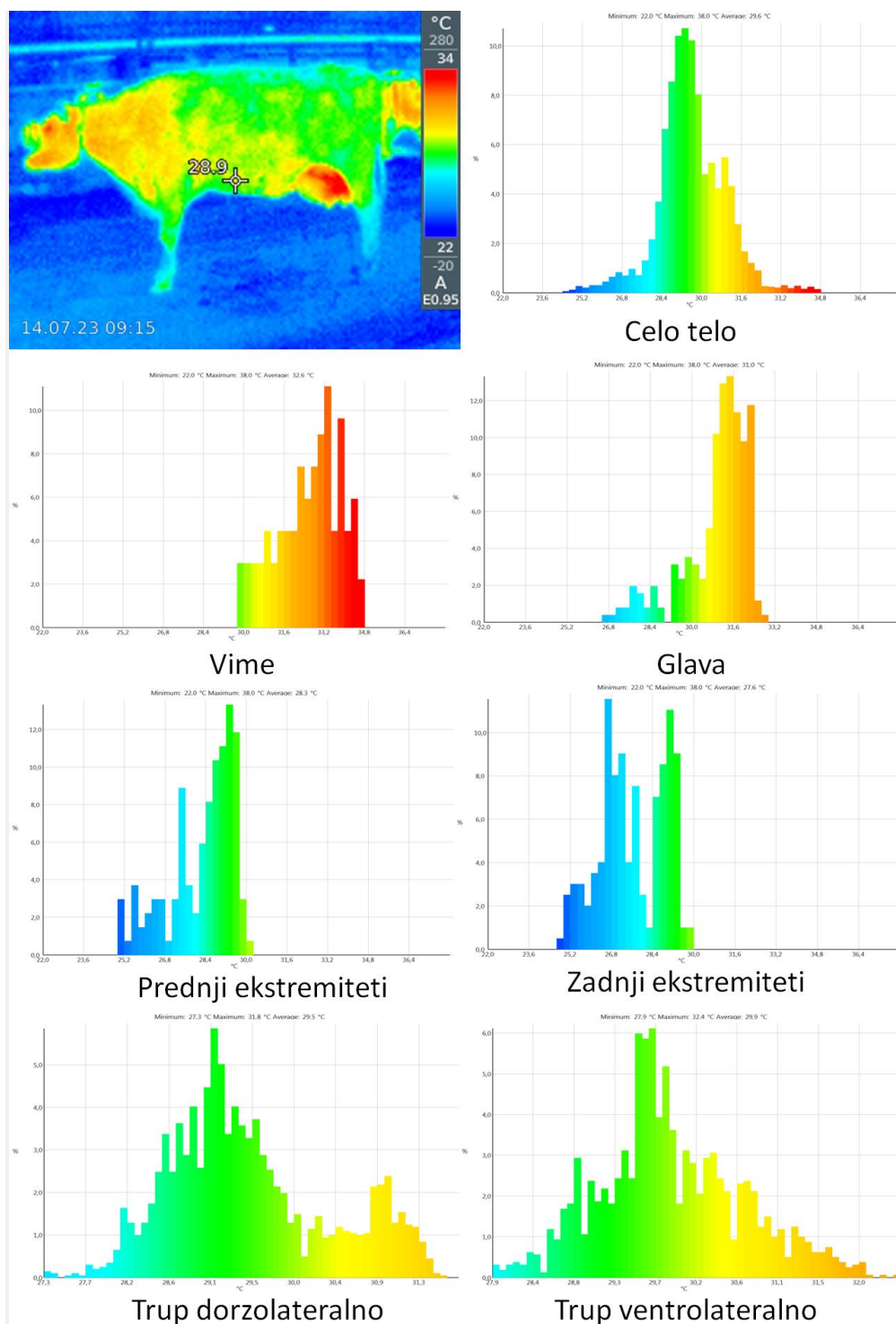
MATERIJAL I METOD

U ogled je uključeno 30 krava Holštajn-frizijske rase u laktaciji. Krave su hranjene standardnom krmnom smešom pomoću TMR obroka. Voda je bila dostupna ad libitum. Krave su boravile u intenzivnom uzgoju i poluotvorenom objektu. Merenje telesne temperature vršeno je pomoću neinvazivne termovizijske kamere Testo 865 (Nemačka). Snimanje je vršeno lateralno sa približno iste udaljenosti od životinje od oko 2m. Tokom snimanja krave nisu remećene u svom trenutnom ispoljavanju ponašanja. Jedan snimak je napravljen tokom najtoplijeg dela dana (kada je THI indeks iznad 72), a drugi snimak tokom termoneutralnog perioda dana (kada je THI indeks ispod 72). Dobijeni termogrami su statistički obrađeni pomoću IRTSoft softvera specijalizovanog za obradu slika dobijenih Testo kamerom. U radu će biti prikazan tipičan termogram krave u termoneutralnom periodu i toplotnom stresu i distribucija frekvencija (grafički prikaz, srednja vrednost, minimalna vrednost i maksimalna vrednost) izmerenih telesnih temperatura u preko 10000 tačaka za sledeće regije: celo telo, vime, glavu, prednje ekstremitete, zadnje ekstremitete, dorzo-lateralnu stranu abdomena i ventrolateralnu stranu abdomena. Podaci su predstavljani kao fuzija podataka od svih 30 ispitivanih krava. Urađen je t-

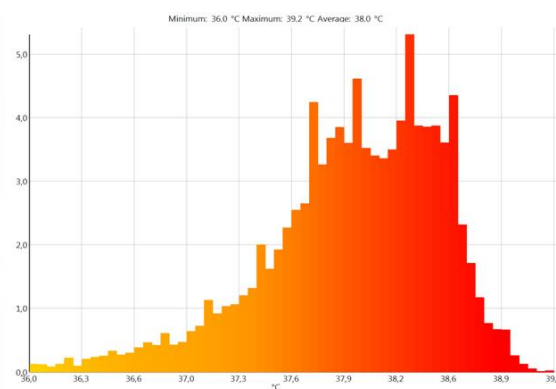
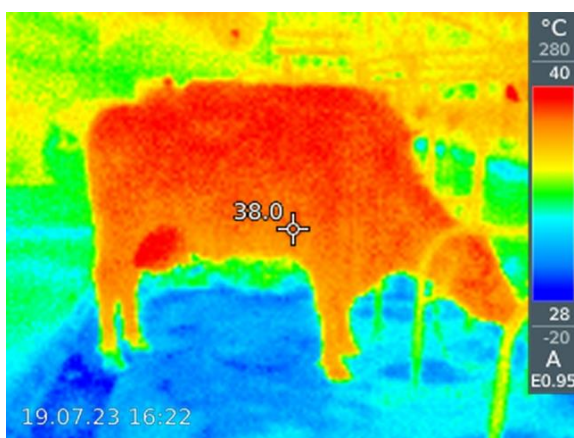
test parova u cilju ispitivanja statističke značajnosti razlika izmerene srednje vrednosti temperatura za krave u termoneutralnom periodu i toplotnom stresu. Korišćen je statistički paket SPSS (IBM, SAD).

REZULTATI

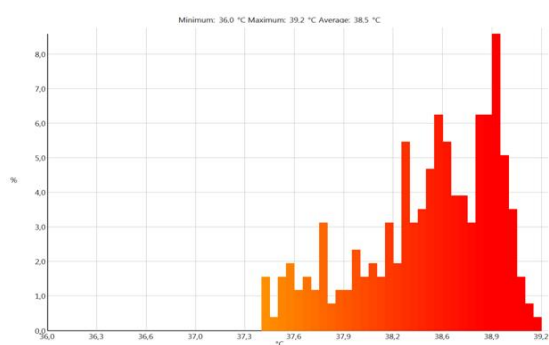
Tipični termogram krava u termoneutralnom periodu sa pripadajućim distribucijama frekvencije temperature površine odabranih delova tela prikazan je na slici 1, dok su na slici 2 prikazani podaci za krave u termoneutralnom periodu. Rezultati t-testa parova biće prikazani kao nivo statističke značajnosti za svaku regiju posebno.



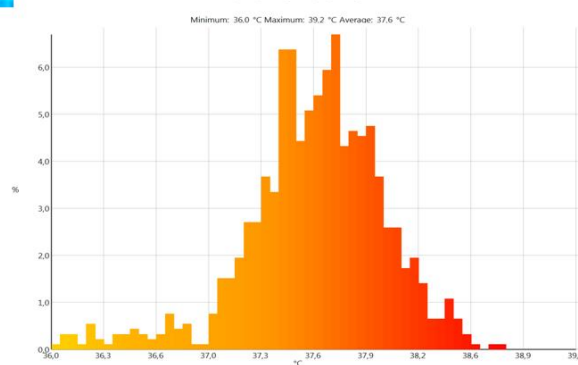
Slika 1: Temperatura površine različitih regija tela kod krava u termoneutralnom period



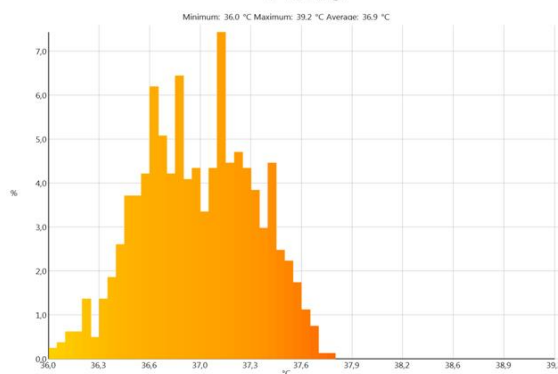
Celo telo



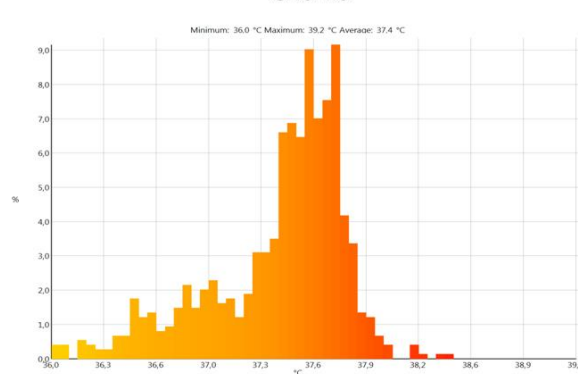
Vime



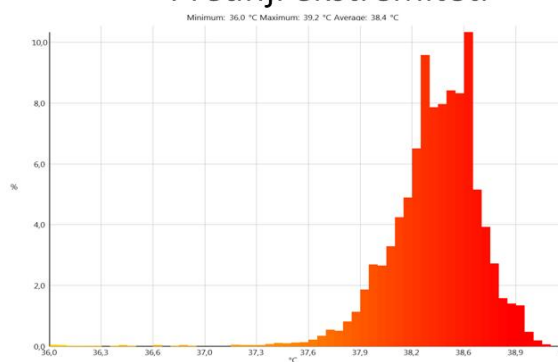
Glava



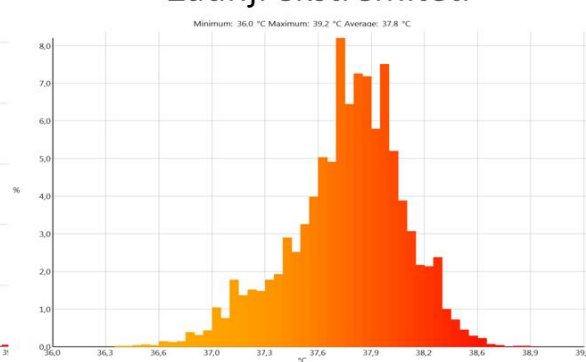
Prednji ekstremiteti



Zadnji ekstremiteti



Trup dorzolateralno



Trup ventrolateralno

Slika 2: Temperatura površine različitih regija tela kod krava u toplotnom stres

Razlikovanje krava u termoneutralnom periodu i toplotnom stresu moguća je jednostavnom adspekcijom termograma. Prikazane su različite boje površine tela, tako da kod krava u termoneutralnom periodu dominiraju zelena do žuta i narandžasta površina tela, dok je površina tela kod krava u toplotnom stresu zauzimala tonove od narandžastih do crvenih. Raspored boja nije vezan samo za izmerenu temperaturu već i za odnos koji temperature tela međusobno ispoljavaju odnosno raspon izmerenih temperatura. Raspon temperatura koji je izmeren na površini tela kod krava u termoneutralnom periodu bio je od 22-38°C, dok je u toplotnom stresu bio od 36-39,5°C. Najtoplija regija tela je vime i ona se u oba slučaja prikazuje kao najintenzivnije crveno obojena regija. Pogledati termogram krava na slici 1 i 2.

Postojale su značajne razlike u srednjim vrednostima temperatura različitih delova tela u termoneutralnom periodu i toplotnom stresu i to za: celo telo 29,6:38°C ($p<0,0001$); vime 32,6:38,5°C ($p<0,0001$); regija glave 31:37,6°C ($p<0,0001$); prednji ekstremiteti 28,3:36,9°C ($p<0,0001$); zadnji ekstremiteti 27,6:37,4°C ($p<0,0001$); dorzalni deo abdomena 29,5:38,4°C ($p<0,0001$) i ventralni deo abdomena 29,9:37,8°C ($p<0,0001$).

Kada se posmatra oblik distribucija frekvencija za temperaturu tela vidimo da je distribucija za celo telo normalna i simetrična u termoneutralnom periodu, dok je blaga asimetrija udesno sa određenim istaknutim najtoplijim tačkama prikazana kod toplotnog stresa. Distribucije ostalih delova tela pokazuju veći stepen asimetrije, često sa izraženijom bimodalnošću.

DISKUSIJA

Kod procene toplotnog opterećenja perifernih delova tela, temperatura ekstremiteta je važan pokazatelj. Merenja temperature perifernih delova tela potvrdila su veću varijabilnost jer formiraju određenu vrstu medijuma između tela i temperature okoline, uglavnom putem procesa konvekcije (16). Biološki, IRT svakog regiona spoljašnje površine tela varira u zavisnosti od lokalnog tkivnog metabolizma i protoka krvi kao i

sposobnosti tela da apsorbuje i emituje zračenje (17). Ekstremiteti su važni izvori gubitka toplote kod goveda (18,19). Promene u perifernim IRT su dominantniji u proksimalnom delu ekstremiteta u odnosu na druge delova tela, jer je mišićna struktura mnogo aktivnije implementirana u održavanje telesne mase, pa je i povećan obim krvi u krvnim sudovima koji vaskularizuju to područje (20,21). IRT spoljašnjih površina tela pokazuje potencijal da proceni stepen promene telesne temperature kao odgovor na mikroklimatske uslove.

Jedno istraživanje (22) je imalo za cilj da ispita temperature određenih regija tela tokom trajanja toplotnog stresa. Vrednosti THI indeksa su se kretale 69,2 do 89,69. Izmerena temperatura okoline je bila od 20,7 do 37,9°C; dok je relativna vlažnost bila od 52% do 95%. Rezultati su pokazali da je najviše izmerena temperatura bila u infraorbitalnoj regiji, lateralnom delu vimena, bočnom delu vimena, levoj polovini tela i desnoj polovini tela. Primećena je i pozitivna korelacija između toplotnog opterećenja i izmerene regije oka i leve polovine tela, dok je umerena korelaciona veza nađena između regije oka i lateralne strane donjeg dela akropodijuma. Pokazano je da su najtopliji delovi tela pripadali regiji glave (23). Regija bokova je imala nešto niže izmerene temperature, dok su najniže temperature zabeležene u regiji ekstremiteta. Razlog za nastale promene se može objasniti time da se kod toplotnog opterećenja krava aktiviraju mehanizmi za odavanje viška toplote pa se kao posledica periferne vazodilatacije krvnih sudova kože krv šalje u vitalne organe. Shodno navedenom, određene regije pokazuju višu temperaturu usled prisustva veće količine krvi (24).

Merenje površine telesne temperature je veoma značajno jer se pokazalo da postoji povezanost povišene temperature infraorbitalne regije sa vrednostima THI indeksa, dok su distalni delovi ekstremiteta imali nešto nižu temperature (25). Na osnovu rezultata istraživača može se zaključiti da temperatura određenih područja (infraorbitalna regija, područje vrata, leđa, stomaka, vimena, distalnih delova ekstremiteta) predstavlja dobre indikatore za procenu toplotnog opterećenja (26). Vime se takođe smatra dobrim indikatorom toplotne opterećenosti. U istraživanjima je nađeno da je temperatura vimena u najtoplijem delu dana iznosila 30,71°C (27, 28). Istraživači su napravili

infracrveni termogram temperature tela neposredno pre i nakon hlađenja. Temperatura okoline je bila između 27 i 31°C. Rezultati merenja su pokazali da nakon rashlađivanja u trajanju od 60 sekundi temperatura u izmerenim regijama je bila niža za 1,2°C. Utvrđeno je da termografska merenja određenih regija tela (leva polovine vimena, zadnji deo vimena) pokazuju različit stepen korelacije sa fiziološkim parametrima toplotnog stresa (rektalna temperatura, frekvencija disanja, srčana frekvencija i dahtanje) (29). Umerena korelaciona veza je nađena između temperature oka i rektalne temperature (0,57) kao i između zadnjeg dela vimena i rektalne temperature (0,69). Visoka korelaciona povezanost je nađena između lateralnog dela vimena i rektalne temperature (0,74). Umerena regresiona veza je nađena između regija koje su slikane i respiratorne frekvence, kao i sa frekvencom srčanog rada. S obzirom da je rektalna temperatura pokazala najveću regresionu povezanost sa termogramima, smatra se da je ona dobar pokazatelj toplotnog opterećenja. Regije koje se smatraju signifikantnim za procenu toplotnog stresa su lateralna površina vimena i zadnji deo vimena. Razlog za ovakve nalaze se može objasniti činjenicom da kod toplotnog stresa organizam pokušava da se oslobodi viška toplote, pa uključuje kompenzatorne mehanizme za njeno odavanje (povećanje rektalne temperature, povećanje srčane frekvence i frekvence disanja). Takođe je nađena umerena korelaciona veza između termograma i temperatura izmerenih u popodnevnom časovima, što ukazuje da je najveće toplotno opterećenje u popodnevnom časovima. Nađene su umerene do visoke korelacije (0,58–0,88) između temperature površine kože i vrednosti THI indeksa (30). Temperature zadnjeg dela i levog boka imale su nižu korelaciju sa vrednostima THI indeksa (0,58 i 0,62). Temperature prednjih papaka bile su u visokoj korelaciji sa vrednostima THI indeksa (levo: 0,83; desno: 0,88). Temperature desnog boka i glutealne regije su imale nižu korelaciju sa temperaturom okoline u poređenju sa temperaturom papaka. Temperaturna razlika između levog i desnog boka zajedno sa temperaturom celog tela i trupa imala je direktnu korelacionu vezu sa vrednostima THI indeksa.

Činjenica da su zadnji deo tela i levi bok pokazali nižu korelaciju sa vrednostima temperature okoline od ostalih delova tela nije iznenađujuće. U jednoj studiji (31), temperatura zadnjeg dela tela je bila najponovljivija IR osobina merena u dva uzastopna dana. Ova činjenica sugerise da je ova lokacija prilično temperaturno stabilna i da se neće odraziti na promene temperature okoline.

Proučavani su efekti evaporativnog hlađenja tokom ekspozicije toplotnom stresu kod izraelskih Holštajna koristeći infracrvene kamere (32). Životinje su dva sata naizmenično prskane vodom u trajanju od 0,5 minuta, a zatim su hladjene ventilatorima (3m/s) u trajanju od 4,5 min. Njihova rektalna temperatura je pala sa 38,2°C na 36°C i ostala nepromenjena još sat vremena. Termogrami krava su takođe otkrili pad od 1,5°C koji je nastao kao posledica hlađenja. Kao deo istraživanja zaštite goveda od visokih temperatura okoline, urađen je ogled koji podrazumeva termografsko praćenje temperatura površine tela neposredno pre, 15, 30 i 45 minuta nakon hlađenja, kao i nakon potpunog sušenja (27). Odredili su i najtoplije zone na koje su bile izložene visokim temperaturama. Temperature vazduha u vreme ogleda su bile između 27 i 31°C. Goveda su prskana vodom u trajanju od 60 sekundi, pomoću specijalnih prskalica postavljenih iznad. Najtoplije zone su bile regija vrata, ramena i rebara. Nakon završenog perioda hlađenja srednja temperatura površine tela je pala za 1,2°C tokom 45 do 60 minuta.

Osim upotrebe termovizijske kamere, za procenu toplotnog opterećenja postoje i osetljivije metode. Jedna od njih je kačenje automatskog sistema za praćenje temperature na metatarzusu krave. Ovakav način procene toplotnog opterećenja pokazuje izuzetno preciznu pozitivnu korelaciju sa temperaturom izmerenom klasičnom termovizijskom kamerom (33). Ova metoda pokazuje da vrednosti THI indeksa direktno utiču na temperature određenih regija tela, koja se smatraju signifikantnim za procenu toplotnog stresa. Osim navedenog, prednost korišćenja termovizijske kamere je u tome što postoji mogućnosti kontinuiranog praćenja temperature krava na farmi i predstavlja koristan izvor podataka u konceptu digitalizacije farme krava.

ZAKLJUČAK

Diurnalno variranje temperature površine tela u termoneutralnom i stresnom periodu dana kod krava na farmama je statistički značajno, tako da su distribucije temperatura i srednje vrednosti za pojedine regije više u najtoplijem delu dana. Dobijeni podaci ukazuju da je neophodno da se kontinuirano tokom dana beleže telesne temperature krava kako bi se procenila stresna opterećenost. Pored navedenog u obzir se moraju uzeti izmerene srednje temperature ali i karakteristike distribucija frekvencije temperature za određenu regiju kako bi tumačenje termalne opterećenosti bilo potpuno.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat projekta broj 142-451-3035/2023-01/01, koji je finansiran od strane Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost Vojvodine.

LITERATURA

1. Majkić M., Cincović M. R., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović M. Relationship between milk production and metabolic adaptation in dairy cows during heat stress. *Acta Agriculturae Serbica* 2017, 22(44): 123-131.
2. Majkić M. Cincović M.R., Belić B., Plavša N., Hristov S., Stanković B., Popović-Vranješ A. Variations in milk production based on the temperature-humidity index and blood metabolic parameters in cows during exposure to heat stress. *Animal Science Papers and Reports* 2018, 36(4): 359-369.
3. Petrović Ž.M., Đoković R., Ilić Ž.Z., Rakonjac S., Bogosavljević Bošković S., Kurćubić V. Petrović D.M. Uticaj sezone na koncentraciju proteina toplotnog šoka hsp70 u krvi krava *Veterinarski pregled* 2020, 1(1): 112-121
4. Cincović M. R., Majkić M., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović M. Thermal comfort of cows and temperature humidity index in period of 2005-2016 in Vojvodina region (Serbia). *Acta Agriculturae Serbica* 2017, 22(44): 133-145.
5. Majkić M., Plavša N., Cincović M., Belić B., Lakić I. Vrednosti indeksa temperature i vlažnosti vazduha (THI) u sedam mernih stanica i procena toplotnog stresa krava na teritoriji vojvodine 2020. *Veterinarski pregled* 2020, 1(1): 83-90
6. Radinović M., Davidov I., Kovačević Z., Galfi A., Pajić M., Erdeljan M., Stanojević J. Uticaj uzročnika mastitisa na proizvodnju mleka kod krava. *Veterinarski pregled* 2020, 1(1):127-133
7. Stanojević J., Radinović M. Koncentracija kalcijuma, neorganskog fosfora i magnezijuma u krvi krava u toplotnom stresu. *Veterinarski pregled* 2020, 1(1):140-147
8. Petrović K., Štrbac F., Stojanović D. Uticaj aplikacije niacina na vrednosti TNF- α , haptoglobina i fibrinogena kod krava u peripartalnom periodu. *Veterinarski pregled* 2021, 2 (1): 26-34
9. Todorović S., Ružić Z., Radinović M., Kanački T., Stanojević J., Galić I. Uticaj aplikacije selena (promtselen®) u prepartalnom periodu na pojavu zaostajanja posteljice kod prvotelki. *Veterinarski pregled* 2021 2 (1): 60-64
10. Stanojević J., Radinović M., Cincović M.R. Parametri metaboličkog profila kod krava sa subkliničkim i kliničkim mastitisom. *Veterinarski pregled* 2022, 3(1): 39-45
11. Čukić A., Rakonjac S., Djoković R., Cincović M., Bogosavljević-Bošković S., Petrović M., Andjelić B. Influence of Heat Stress on Body Temperatures Measured by Infrared Thermography, Blood Metabolic Parameters and Its Correlation in Sheep. *Metabolites* 2023, 13(8): 957-971
12. Idris M., Uddin J., Sullivan M., McNeill D. M., Phillips C.J. Non-invasive physiological indicators of heat stress in cattle. *Animals* 2021, 11(1): 71.
13. Sejian V., Shashank C. G., Silpa M. V., Madhusoodan A. P., Devaraj C., Koenig S. Non-Invasive Methods of Quantifying Heat Stress Response in Farm Animals with Special Reference to Dairy Cattle. *Atmosphere* 2022, 13(10): 1642.
14. Hurnik J.F., Webster A.B., DeBoer S. An investigation of skin temperature differentials in relation to estrus in dairy cattle using a thermal infrared scanning technique. *Journal of Animal Science* 1985, 61 (5): 1095–1102.
15. Berry R. J.; Kennedy A. D., Scott S. L., Kyle B. L, Schaefer A. L. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Canadian Journal of Animal Science* 2003, 83: 687-693.
16. Sokabe T., Tominaga M. Molecular mechanisms underlying thermosensation in mammals. *Brain Nerve* 2009, 61: 867–873.
17. Taylor N.A.S., Tipton M.J., Kenny G.P. Considerations for the measurement of core, skin and mean body temperatures. *J. Therm. Biol.* 2014, 46: 72–101
18. Klir J. J., Heath J. E. An infrared thermographic study of surface temperature in relation to external thermal stress in three species of foxes: the red fox (*Vulpes vulpes*), arctic fox (*Alopex lagopus*), and kit fox (*Vulpes macrotis*). *Physiological zoology* 1992, 65(5): 1011-1021.

19. Van Den Heuvel C.J., Ferguson S.A., Gilbert S.S., Dawson D. Thermoregulation in normal sleep and insomnia: The role of peripheral heat loss and new applications for digital thermal infrared imaging (DITI). *J. Therm. Biol.* 2004, 29: 457–461
20. Cockcroft P.D., Henson F.M.D., Parker C. Thermography of a septic metatarsophalangeal joint in a heifer. *Vet. Rec.* 2000, 146: 258–260.
21. Nikkhah A. Plaizier J.C.; Einarson M.S., Berry R.J. Scott S.L., Kennedy A.D. Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 2005, 88: 2749–2753.
22. Martello L. S., De Silva S. D. L., Da Costa Gomes R., Da Silva Corte R., Leme P. R. Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in *Bos indicus* cattle in tropical conditions. *International journal of biometeorology* 2016, 60(1): 173-181.
23. Da Silva R.G. Weather and climate and animal production. Update of the guide to agricultural meteorological practices 2006, 134: 1-36
24. Poikalainen V., Praks J., Veermäe I., Kokkin E. Infrared temperature patterns of cow's body as an indicator for health control at precision cattle farming. *Agronomy Research Biosystem Engineering Special* 2012, 10(1): 187-194.
25. McManus C., Tanure C. B., Peripolli V., Seixas L., Fischer V., Gabbi A. M., Costa Jr J. B. G. Infrared thermography in animal production: An overview. *Computers and Electronics in Agriculture* 2016, 123: 10-16.
26. Schaefer A. L., Cook N., Tessaro S. V., Deregt D., Desroches G., Dubeski P. L., Godson D. L. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. *Canadian journal of animal science* 2004, 84(1): 73-80.
27. Knižková I., Kunc P., Gürdil G. A. K., Pinar Y., Selvi K. C. Applications of infrared thermography in animal production. *Journal of the Faculty of Agriculture* 2007, 22(3): 329-336.
28. Porcionato M. A. F., Canata T. F., De Oliveira C. E., Dos Santos M. V. Udder Thermography Of Gyr Cows For Subclinical Mastitis Detection/Termografia Do Úbere De Vacas Gir Para Detecção De Mastite Subclínica. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas* 2009, 3(3):251-257.
29. Daltro D. D. S., Fischer V., Alfonzo E. P. M., Dalcin V. C., Stumpf M. T., Kolling G. J., McManus C. Infrared thermography as a method for evaluating the heat tolerance in dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2017, 46: 374-383.
30. Montanholi Y.R., Odongo N.E., Swanson K.C., Schenkel F.S., McBride B.W., Miller S.P. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos taurus*). *Journal Therm Biology* 2008, (33):468–75
31. Montanholi Y. R., Schenkel F. S., Miller S. P., Swanson K. C., Mandell I. B. 2006. Infrared images taken in beef cows: repeatability of the measurements. In *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18. August, 2006, pp. 03-63. Instituto Prociência.
32. Kimmel E., Arkin H., Broday D., Berman A. A model of evaporative cooling in a wetted hide. *Journal of agricultural engineering research* 1991, 49, 227-241.
33. Kou H Zhao Y Ren K., Chen X., Lu Y., Wang D. Automated measurement of cattle surface temperature and its correlation with rectal temperature. *PLoS ONE* 2017, 12(4):126-130.

**PRAKTIČNE SMERNICE ZA PRAVILNU IZRADU KRVNIH RAZMAZA –
PREGLEDNI RAD**
*PRACTICAL GUIDELINES FOR THE PROPER PREPARATION OF BLOOD
SMEARS - A REVIEW PAPER*

**Zoran Ružić^{a*}, Zdenko Kanački^a, Slobodan Stojanović^a, Dragoljub Marić^a,
Zorana Kovačević^a, Srđan Todorović^a, Milenko Rikić^a, Slobodan Knežević^b,
Suzana Vidaković Knežević^b, Dušan Lazić^b**

^aDepartman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

^bNaučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Rumenački put 20, 21000 Novi Sad

^aDepartment of veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

^bScientific veterinary institute Novi Sad, Rumenački put 20, 21000 Novi Sad

*Autor za kontakt: ruzicvet@gmail.com

SAŽETAK

U savremenoj veterinarskoj medicini, prilikom pregleda životinja, redovno se uzima krv za laboratorijske analize. Krv se koristi da bi se dobio uvid u zdravstveno stanje jedinke, odnosno za hematološke i biohemijske analize, kao i za druge neophodne analize. Jedan od prvih i najstarijih dijagnostičko-laboratorijskih metoda jeste krvni razmaz. Krvni razmaz predstavlja hematološki preparat koji se dobija tako što se kap pune krvi stavi na predmetno staklo i pomoću mikroskopske pločice raširi na predmetnom staklu. Ovako napravljen hematološki preparat se pregleda pod mikroskopom i dobija se uvid o karakteristikama krvi i njenih elementa. Ovaj rad ima za cilj da se istaknu različitije metode pripreme krvnih razmaza, kao i da se istaknu osnovne smernice prilikom njihove izrade, kako bi veterinari kliničari imali podsetnik i smernice za pravilnu pripremu preparata u dijagnostičke svrhe.

Ključne reči: bojenje preparata, krv, krvni razmaz, protocol

ABSTRACT

In contemporary veterinary medicine, during animal examinations, blood is routinely collected for laboratory analyses. Blood is used to gain insight into the individual's health status, specifically for hematological and biochemical analyses, as well as other necessary tests. One of the earliest and oldest diagnostic laboratory methods is the blood smear. A blood smear is a hematological preparation obtained by placing a drop of blood on a microscope slide and spreading it using a coverslip. The resulting hematological preparation is examined under a microscope to provide insights into the characteristics of blood and its components. This paper aims to highlight various methods for preparing blood smears and to emphasize the fundamental guidelines in their creation. The goal is to provide clinical veterinarians a reminder and guidance for the proper preparation of specimens for diagnostic purposes.

Key words: blood, blood smear, staining, protocol

UVOD

Krvni razmaz predstavlja jedan od najraširenijih i najčešće korišćenih laboratorijskih testova u veterinarskoj medicini. Kao klinička dijagnostička procedura, krvni razmaz se počeo koristiti krajem 18. veka i od tada predstavlja nezamenjivi dijagnostički alat u veterinarskim ustanovama. Ne može se sa sigurnošću utvrditi ko je prvi počeo koristiti krvni razmaz kao kliničko-laboratorijsku proceduru, ali se zna da Antoni van Levenhuk (*Antonie van Leeuwenhoek*) u sedamnaestom veku prvi opisuje krvne ćelije na osnovu preparata pune krvi. Kasnije, u devetnaestom veku, uvođenje i korišćenje anilinskih boja prilikom pravljenja krvnih razmaza i njihovim pregledom pod mikroskopom, omogućilo je individualno proučavanje krvnih ćelija. Paul Erlih (*Paul Ehrlich*) je 1856. godine uveo eozin kao prvu boju koja se koristi za bojenje krvnih razmaza. 1865. godine je uveden i hematoksin, a nakon toga i metahromatske Romanovski boje. Od tog perioda, pa do sada, usavršavane su tehnike koje se uglavnom sastoje od poboljšanja u kvalitetu boja, postupcima bojenja, automatizaciji pripreme mikroskopskih stakala, ali sama procedura pripreme i analize krvnog razmaza se nije menjala (1).

KLINIČKI ZNAČAJ

Krvni razmaz je prvi korak u proceni celokupnog zdravstvenog statusa organizma. Koristi se za određivanje distribucije leukocita, odnosno leukocitarne formule. Pregled krvnog razmaza, kao jednostavna i jeftina metoda, nam može dati veliki spektar dijagnostičkih informacija. Primer toga jeste promena morfologije eritrocita, koja nam može ukazivati na hroničan gubitak krvi, kao i izloženost raznim toksinima koji dovode do hemolize eritrocita. Promenjena morfologija belih krvnih zrnaca nam može ukazati na prisustvo inflamatornog odgovora organizma, a takođe može ukazati i na leukemije. U nekim slučajevima, kao što je prisustvo patognomoničnih ćelijskih inkluzija ili neoplastičnih ćelija, krvni razmaz može poslužiti i u postavljanju konačne dijagnoze (2,3,4,5).

Osim morfoloških promena krvnih elemenata, prilikom mikroskopskog pregleda krvnog razmaza mogu se uočiti i parazitske infestacije. Jedna od parazitskih infestacija koja se može uočiti jeste dirofilarioza. *Dirofilarioza* jeste bolest izazvana srčanim crvom *Dirofilaria immitis* i klinički je najznačajnija kod pasa. Jedna od dijagnostičkih procedura koje se koriste kod ovog oboljenja jeste dokazivanje postojanja mikrofilarija u krvi mikroskopskim pregledom krvnog razmaza (6).

Osim dirofilarioze, jedno od najčešćih parazitskih oboljenja koje se dijagnostikuje pregledom krvnog razmaza jeste i babezioza. Babezioza je oboljenje sisara koje je uzrokovano brojnim vrstama protozoa iz roda *Babesia*. Predilekciono mesto za ovu protozou jesu eritrociti, u kojima se ovaj parazit nalazi u obliku bisaga (7).

Priprema krvnog razmaza za osnovni cilj ima širenje ćelija, odnosno eritrocita, belih krvnih zrnaca i trombocita, tako da se dobije jednosloj (monosloj) ćelija. U tom monosloju ćelija, eritrociti bi trebali da se nalaze jedni pored drugog i da se retko dodiruju. Bela krvna zrnca treba da budu lepo raspoređena i vidljiva, kao i dobro obojena prilikom bojenja radi procene citoplazmatskih i nuklearnih karakteristika. Trombociti treba da se nalaze ravnomerno raspoređeni i dobro vidljivi. Ukoliko je sloj krvi na predmetnom staklu previše debeo, krvne ćelije su kontrahovane previše, ili im je nejasna morfologija i loše su obojene. Takođe, u pretankom sloju krvnog razmaza dolazi do promene u morfologiji ćelija, gde se uočavaju oštećene ivice ćelija, što otežava klasifikaciju i morfološku procenu samih ćelijskih elemenata (2).

Literaturni podaci navode da je čak 70% kliničkih odluka i dijagnoza podržano nekom laboratorijskom dijagnostikom (8). Krvni razmaz je osnovno i visoko informativno hematološko sredstvo koje je na raspolaganju kliničarima u skriningu, dijagnostici, praćenju progresije bolesti i praćenju odgovora na terapiju. Dobro razumevanje interpretacije razmaza krvi je važno za uspešnu kliničku praksu (9).

Uprkos napretku u automatizaciji hematologije i primenom molekularnih tehnika, krvni razmaz je ostao veoma važan dijagnostički test, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. A kvalitetan razmaz, detaljan pregled i pravilnu interpretaciju u skladu sa kliničkim stanjem pacijenta treba da obezbedi veterinar (9).

Zbog svega navedenog, za cilj ovog rada postavljamo da se istaknu najčešće korišćene metode prilikom pripreme krvnih razmaza, kao i osnovne smernice u njihovoj izradi, sve do procesa pregleda preparata pod mikroskopom.

Mikroskopski pregled neće biti tema ovog rada zbog svoje kompleksnosti i opširnosti, te prevazilazi temu koju se bavimo.

PRIPREMA KRV I ZA IZRADU RAZMAZA

Da bi se osigurali tačni i pouzdani rezultati, moraju se kontrolisati preanalitičke varijable koje mogu uticati na kvalitet krvnog razmaza. Prvobitno, odnos krvi i antikoagulansa treba da bude u odgovarajućoj srazmeri, na šta najčešće ne moramo da obraćamo pažnju ukoliko se venska krv uzima u epruvetama sa vakum sistemom koji u svojoj unutrašnjosti sadrže antikoagulans. Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) je antikoagulans izbora prilikom uzimanja krvi za ovu proceduru. Krvne razmaze je najbolje napraviti u roku od 2 sata od momenta uzimanja krvi. Kašnjenje u pripremi razmaza krvi može omogućiti degeneraciju ćelijskih elemenata krvi i može dovesti do pseudo-trombocitopenije zbog formiranje trombocitnih agregata (9). Neposredno pre uzimanja kapljice krvi iz epruvete neophodno je blago pomešati krv kako bi se izbegla sedimentacija ćelija u epruveti. Ukoliko se krvni razmazi prave sa kapilarnom krvlju, neophodno je napraviti ubod tkiva i pri tome treba voditi računa da se obezbedi minimalno oštećenje tkiva. Takođe je neophodno imati na umu da višak tkivne tečnosti utiče na distribuciju ćelijskih elemenata krvi, te je s toga bolje koristiti lancete nego obične igle za ubod u tkivo.

TEHNIKE PRAVLJENJA KRVNIH RAZMAZA

U naučnoj literaturi se navodi više tehnika izrade krvnih razmaza od kojih se u praksi najčešće koristi takozvana „klin“ metoda o kojoj će u ovom radu biti najviše reči. Pored nje, takođe se u praksi često upotrebljava i „krst“ metoda, odnosno metoda sa predmetnim staklom i pokrovnim staklom, kao i metoda sa dva pokrovnostakla (10).

„KLIN“ METODA (TWO SLIDE “WEDGE” METHOD)

Kod ove metode se kap dobro izmešane krvi stavlja na takozvani klizač, odnosno predmetno staklo, blizu kraja jedne ivice (1 centimetar od ivice) (10). Kap krvi se nanosi pomoću plastičnih kapilarnih ili mikrohematokritskih cevčica. Staklene cevčice nisu preporučene za upotrebu, zbog mogućnosti njihovog lomljenja (1). Drugo predmetno staklo koje služi za širenje (razvlačenje) kapi krvi stavlja se na osnovno predmetno staklo (klizač) ispred krvi i pomera unazad da bi dodirnulo kap krvi. Prilikom tog dodira, krv se širi duž osnovne širine stakla. Pod uglom od 30-40 stepeni, u odnosu na donje predmetno staklo, gornjim predmetnim staklom vrši se povlačenjem laganim pokretom do kraja predmetnog stakla (klizača) (10). Ova metoda prikazana je na Slici 1.

Razmazi krvi ukoliko se pravilno naprave, imaju glatki prelaz od debelog sloja do tankog sloja (2). Faktori koji utiču na debljinu krvnog razmaza su: veličina kapi krvi, broj crvenih krvnih zrnaca i ugao između predmetnih stakala (11). Previše tanak krvni razmaz može dovesti do promene u morfologiji eritrocita, koji dobijaju izgled sferocita, dok su bela krvna zrnca previše uveličana (12). Ukoliko se predmetno staklo koje služi za razvlačenje kapi krvi po klizaču drži u previše tupom uglu, ili ukoliko je pritisak na klizač prejak, dolazi do nejednakog razmazivanja krvi po klizaču. Takođe, preveliki pritisak dovodi do toga da se leukociti, nakupljaju duž ivice samog krvnog razmaza. Mali pritisak prilikom širenja kapi krvi dovodi do pojave kratkih i debelih mrlja. Faktor koji takođe utiče na debljinu krvnog razmaza jeste i viskozitet krvi. Ukoliko je viskoznost krvi velika, krvni razmaz će biti deblji (2).

Kod uzorka krvi koji ima malu viskoznost, ugao između klizača i tobogana treba da se koriguje, tako da bude tuplji ugao (40-45 stepeni), dok kod viskoviskoznih uzoraka krvi, taj ugao se smanjuje (manji od 30 stepeni) (2).

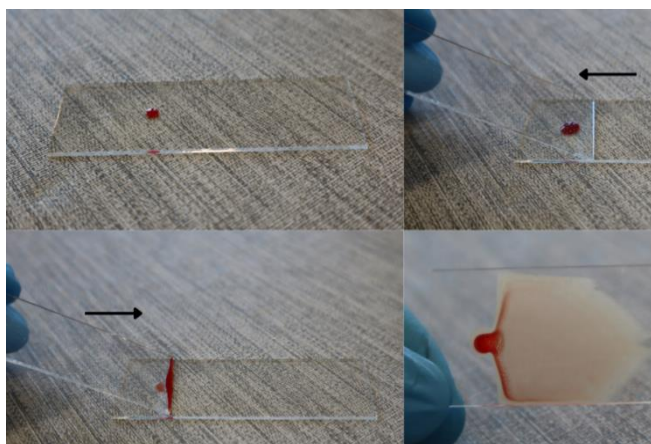
„KRST“ METODA (TWO SLIDE “CROSS” METHOD)

Ova metoda se značajno manje koristi u praksi nego „klin“ metoda. Prednost ove metode je u tome što manje oštećuje ćelije i može se koristiti na terenskim uslovima gde nedostaje ravna i čista površina (13).

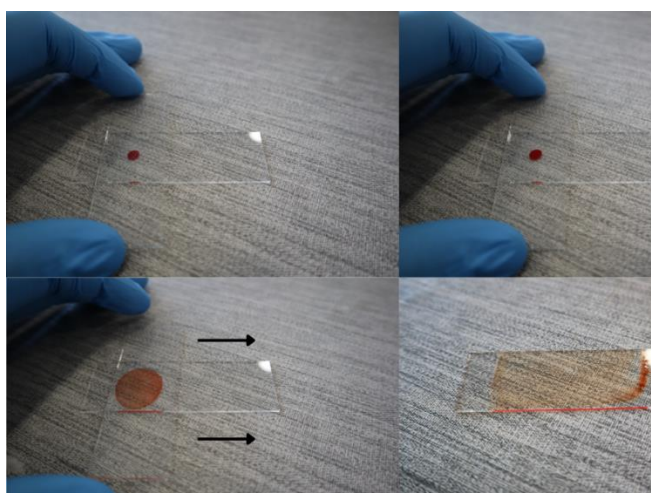
Procedura pravljenja krvnog razmaza ovom metodom je slična kao u prethodnoj metodi. Od opreme je neophodna krv, i dva predmetna stakla. Kap krvi se pomoću mikropipete ili kapilarne cevčice stavi na predmetno staklo, a zatim se sa drugim predmetnim staklom pokriva (pod pravim uglom u odnosu na donje predmetno staklo da bi se formirao „krst“). Pokrivanje se vrši polako i ravno (bez pritiska nadole), krv se širi pod težinom stakla i gornje predmetno staklo se nežno i glatko pomera duž donjeg predmetnog stakla (13). Krvni razmazi proizvedeni ovom metodom obično imaju jajoliki oblik koji je deblji na polovima i manje gust u sredini i sa strane (Slika 2).

METODA SA PREDMETNIM STAKLOM I POKROVNIM STAKLOM (COVER-SLIP AND SLIDE METHOD)

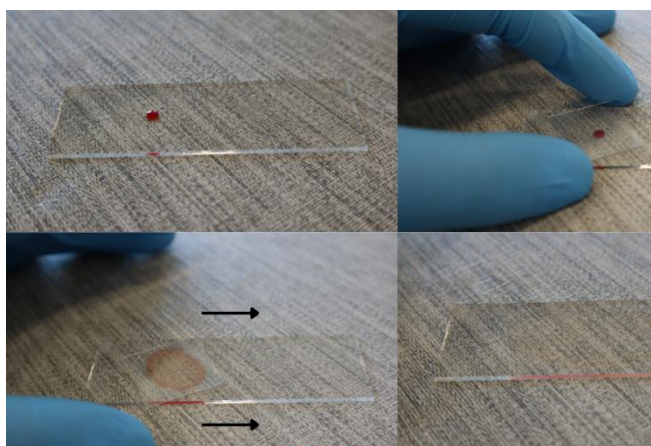
Slično gore navedenoj metodi, umesto drugog predmetnog stakla može se koristiti pokrovno stakalce (Slika 3). Kap krvi se stavlja na predmetno staklo, a zatim se na kap krvi stavlja pokrovno stakalce (bez pritiskanja prstima). Krv se širi pod težinom pokrovnog stakla i pokrovno staklo se povlači duž dugačke ose predmetnog stakla da bi se krv dalje širila. Operater mora da pazi da ne primeni preveliki pritisak i ne polomi pokrovno staklo, jer nastali komadići stakla mogu izazvati povredu operatera i dospevanje fragmenata stakla u krvni razmaz (13).



Slika 1. Izrada krvnih razmaza „klin“ metodom



Slika 2: Izrada krvnih razmaza „krst“ metodom

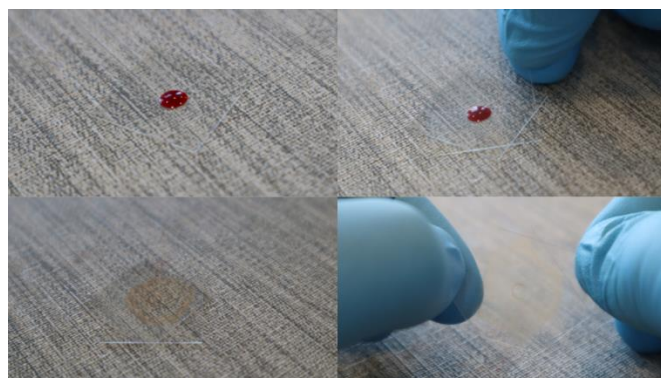


Slika 3: Izrada krvnih razmaza uz pomoć predmetnog i pokrovnog stakla

METODA SA DVA POKROVNA STAKLA (TWO COVER-SLIP METHOD)

Kada su dostupne veoma male količine krvi, metoda „dva pokrovna stakla“ je koristan način za pravljenje razmaza krvi. Kap krvi se stavlja na pokrovno staklo, a zatim se drugo pokrovno staklo stavlja na prvo. Krv se širi pod težinom drugog pokrovnog stakla i kada se razdvoje, stvaraju se dva filma (slika 4). Ova metoda obično oduzima više vremena od ostalih opisanih metoda, posebno zato što se filmovi moraju bojiti ručnim metodama. Nakon bojenja, filmovi se postavljaju na predmetno staklo, bilo na trajni način pomoću medijuma za montažu ili na privremeni način korišćenjem ulja za potapanje (sa stranom na kojoj se nalazi krvni razmaz na dole) (13).

Sve opisane metode mogu se koristiti za izradu krvnih razmaza dovoljnog kvaliteta da bi se omogućilo adekvatno mikroskopsko ispitivanje.



Slika 4: Izrada krvnih razmaza uz pomoć dva pokrovna stakla

ARTEFAKTI PRILOKOM PRAVLJENJA KRVNOG RAZMAZA

Artefakti koji nastaju prilikom pravljenja krvnog razmaza su najčešće uzrokovani lošim tehnikama razvlačenja krvi, sporim sušenjem u vlažnim uslovima ili odloženom fiksacijom. Kao važan faktor koji dovodi do artefakata jeste u suvoća/vlažnost predmetnog stakla. Ukoliko je predmetno staklo bilo vlažno prilikom procesa izrade krvnog razmaza, dolazi do nepravilnog širenja krvi po predmetnom staklu, što utiče na sam izgled krvnog razmaza prilikom njegovog posmatranja pod mikroskopom.

Ćelije krvi takođe mogu biti oštećene, odnosno može doći do promene u njihovim morfološkim karakteristikama. Ukoliko je sušenje preparata krvnog razmaza sporo, dolazi do kontrakcije ćelija krvi. Degenerativne promene u krvnom razmazu, kao što su citoplazmatska vakuolizacija u monocitima i neutrofilima, fragmentacija ćelija sa jedrom ili nuklearna lobulacija, ne nastaju kao posledica loše pripreme krvnog razmaza, već su često povezane sa neadekvatnim i produženim skladištenjem krvnih razmaza (1).

FIKSACIJA KRVNIH RAZMAZA

Fiksacija krvnih razmaza po preporuci se obavlja pre početka bojenja. Neke ustanove prilikom izrade krvnih razmaza i njihovog bojenja, preskaču fiksaciju i krvne razmaze boje odmah nakon sušenja na vazduhu. Ova tehnika u većini slučajeva daje dobre rezultate prilikom bojenja, međutim ako se krvni razmaz iz nekog razloga ne može obojiti, neophodno je izvršiti fiksaciju pre bojenja (11).

Osušeni krvni razmaz se fiksira rastvorom metanola ili etil-alkoholom. Da bi se krvni razmaz dobro fiksirao, potrebno je oko 10 do 20 minuta. Ukoliko je fiksacija nepravilna, ona može da izazove artefakte, u vidu refraktilnih granica eritrocita (9). Fiksacija metanolom se vrši tako što se pločica sa krvnim razmazom potapa u rastvor za fiksiranje (metanol) 5-7 puta na 5-7 sekundi (17).

Fiksaciju krvnog razmaza treba obaviti što pre, najbolje bi bilo u vremenskom intervalu do jednog sata od momenta pravljenja krvnog razmaza. Rastvori za fiksiranje, kao i rastvori za bojenje, trebali bi biti sa što manje vode (najviše 3%), da bi se sprečio nastanak morfoloških artefakata. Preporuka je da se pločice sa krvnim razmazom potapaju u posude sa rastvorima (1).

BOJENJE KRVNIH RAZMAZA

Krvni razmazi se najčešće boje Romanovski bojama, koje se sastoje od hemijskih jedinjenja tiazina i eozina. Postoji nekoliko metoda bojenja koje koriste ove boje i u njih se ubraja: *Wright*, *Wright-Giemsa*, *May-Grünwald-Giemsa* i *Leishman* (15). Karakteristika bojenja po Romanovskom jeste polihromazija, posebno formiranje ljubičaste boje u hromatinu i granulama neutrofila i trombocita. Polihromazija se koristi u cilju razlikovanja populacije srodnih ćelija, posebno ćelija krvi, jer krvne ćelije bivaju obojene u tri boje (crvena, plava i ljubičasta) (16,17). Svi tipovi bojenja su karakteristični po tome što daju bazofilnu boju nukleinskim kiselinama i citoplazmatskim granulama bazofilnih granulocita, dok eozinofilnu boju eritrocitima i eozinofilnim granulocitima (13). Bojenje krvnih razmaza se može vršiti manuelno ili pomoću automatskih uređaja za bojenje. Protokoli po kojima se krvni razmazi boje se često razlikuju između laboratorija.

Diff-Quik bojenje je modifikovano *Wright-Giemsa* bojenje i ovde je istaknuto zbog svoje široke primene u praksi. Za ovo bojenje se koriste gotovi komercijalni rastvori koji se sastoje iz fiksativa metanola (zelena boja), rastvora boje sa Eozinom G u fosfatnom puferu (crvena boja) i rastvora boje tiazina rastvorenog u fosfatnom puferu (plava boje) (14,18).

ZAKLJUČAK

Uprkos velikom napretku u genetskim i molekularnim tehnikama u dijagnostici različitih bolesti, ispitivanje morfologije krvnih razmaza krvi ostaje nezamenljiv alat u hematološkoj praksi. Kako bi veterinari mogli adekvatno da tumače krvne razmaze, pre svega, neophodno je poznavanje odgovarajuće tehnike izrade krvnih razmaza. Ovaj rad pruža uvid u različite metode ove tehnike što može biti korisno veterinarima u svakodnevnoj praksi.

LITERATURA

1. Houwen B. 2002. Blood film preparation and staining procedures. *Clinics in Laboratory Medicine* 2002, 22(1):1-14.
2. Amy C.V., Rick L.C., Theresa E.R., Ronald D.T. *Atlas of canine and feline peripheral blood smears*. First Edition, Elsevier's Health Sciences Rights - Department in Philadelphia, PA, USA, 2014.
3. Nikolić S., Belić B., Cincović M., Lakić I. 2020. Morfometrijske osobine eritrocita pasa i faktori koji na njih utiču. *Veterinarski pregled* 2020, 1(1):90-98.
4. Ružić Z., Kanački Z., Milošević V., Žekić-Stošić M., Savić S., Popovska-Perčinić F., et al. The effect of vitamin C on specific hematologic parameters in broilers during heat stress. In *Proceedings: 5th International Vet-Istanbul Group Congress and 8th International Scientific Meeting "Days of veterinary medicine 2018"*; 23-27 september 2018; Ohrid, North Macedonia. pp 137-138.
5. Ružić Z., Kanački Z., Žekić-Stošić M., Savić S., Knežević S., Vidaković S., i sar. Uticaj termalnog kondicioniranja samostalno i u kombinaciji sa vitaminom C na pojedine hematološke parametre brojlera tokom toplotnog stresa. U: *Zbornik radova. Zdravstvena zaštita i reprodukcija farmskih životinja*; 2019 maj 25; Novi Sad, Srbija, pp 193-200.
6. Spasojević K.Lj., Trailović R.D. *Bolesti pasa i mačaka*. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni Fakultet, Departman za Veterinarsku medicinu, Novi Sad, 2018, pp 145-149.
7. Aleksić N. *Parazitske bolesti*, Fakultet Veterinarske medicine, Beograd, 2004, pp 15-21.
8. Stojić V.R., Lazarević M., Savić V., Vapa M., Gledić D., Fratrić N., Kirovski D. *Veterinarska Fiziologija, Naučna KMD*, 2010, pp 43-60.
9. Adewoyin AS, Nwogoh B. 2014. Peripheral blood film - a review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine* 2014, 12(2):71-9.
10. Tkachuk D.C., Hirschmann J.V. Approach to the microscopic evaluation of blood and bone marrow. In: Tkachuk DC, Hirschmann JV, editors. *Wintrobe Atlas of Clinical Haematology*. Lippincott: Williams & Wilkins; 2007.
11. Heather A. K. *Blood Smear preparation*, Ethos Diagnostic Science Woburn, Peer Reviewed. Massachusetts, 2017.
12. Belić B., Cincović M. *Laboratorijske tehnike u patološkoj fiziologiji*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, 2019.
13. Clark P., Wayne S.J.B., Shane R. *Raidal Atlass of Clinical Avian hematology*, Wiley-Blackwell, UK, 2009.
14. Ryane E. E., Sharon M. Dial, *Low-cost veterinary clinical diagnostics*, University of Arizona College of Veterinary Medicine, Oro Valley, Arizona, USA, 2023. pp. 55-71.
15. Juan-Lluis V. C., Albarède S., Flandrin G., Heller S., Horvath K., Houwen B., Nordin G., Sarkani E., Skitek M., Van Blerk M., Libeer J. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: control material, *Clinical Chemistry Laboratory medicine*, 2004; Berlin, New York 24(8):922-926.
16. Veteriankey. Available at: <https://veteriankey.com/peripheral-blood-smears-3/> Accessed 15.12.2023.
17. Horobin R.W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable-including a proposed universal Romanovswsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme, *Biotechnich & Histochemistry*, The University of Glasgow, Scootland, UK, 2010.
18. Veteriankey. Available at: <https://veteriankey.com/peripheral-blood-smears/> Accessed 15.12.2023.

**UPOTREBA TERMOGRAFIJE U DIJAGNOSTICI ARTRITISA KOD
GOVEDA – PRIKAZ SLUČAJA**
*THE USE OF THERMOGRAPHY IN DIAGNOSTICS OF ARTHRITIS
IN CATTLE - CASE REPORT*

**Jovan Spasojević^{a*}, Mira Majkić^a, Marko Cincović^a, Jovan Stanojević^a,
Ivan Galić^a, Bojan Toholj^a**

^aDepartment za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja
Obradovića 8, 21000 Novi Sad

^aDepartment of veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića
8, 21000 Novi Sad

*Autor za kontakt: jovan.spasojevic1984@yahoo.com

SAŽETAK

Kada je reč o oboljenjima kod goveda, termografija svoju primenu pronalazi pre svega u dijagnostici oboljenja lokomotornog sistema, zatim dijagnostici oboljenja vimeni i kože. Artritis, a naročito septični artritis, predstavljaju jedno od najznačajnijih oboljenja ekstremiteta kod goveda. Infekcije ili povrede, aktiviraju odbrambene mehanizme organizma koji se manifestuju kretanjem toplote kroz tkivo, većim protokom krvi i povećanom temperiranosti površine. Upotrebom termovizijske kamere moguće je u ranim fazama nastanka zapaljenskih procesa detektovati promene u temperiranosti površine u predelu afektiranog tkiva. Poređenjem susednih ekstremiteta i detektovanje promena i razlika u temperiranosti klinički afektiranog i neafektiranog tkiva, već od minimum 0,5 °C, može ukazivati na pojavu zapaljenskih procesa. Rezultati ovog istraživanja, predstavljenog u formi prikaza slučaja, nedvosmisleno ukazuju na to da upotreba termografije upotpunjuje nalaze opšteg kliničkog pregleda pri sumnji na postojanje artritisa, te time značajno utiče na dalji tok dijagnostičkih i terapijskih procedura i protokola.

Ključne reči: termografija, krava, artritis

ABSTRACT

When it is about diseases in cattle, thermography found its application primarily in diagnostics procedures of diseases of the locomotor system, then in diagnostics of udder and skin diseases. Arthritis, especially septic arthritis, is one of the most important diseases in cattle. Infections or injuries activate the body's defense mechanisms, which are manifested by the movement of heat through the tissue, greater blood flow and increased temperature of the surface. Using a thermal imaging camera, it is possible to detect changes in the temperature of the surface in the area of the affected tissue in the early stages of the inflammatory process. By comparing adjacent extremities and detecting changes and differences in the temperature of clinically affected and unaffected tissue, as low as 0.5 °C, it could indicate the occurrence of inflammatory processes. The results of this research, presented in the form of a case report, unequivocally indicate that the use of thermography complements the findings of a general clinical examination when arthritis is suspected, and significantly influencing the further course of diagnostic and therapeutic procedures and protocols.

Key words: termography, cow. arthritis

OPIS SLUČAJA

Ovo istraživanje sprovedeno je u okviru kratkoročnog projekta od interesa za razvoj naučnoistraživačke delatnosti u AP Vojvodini u 2023. godini, pod nazivom: „Rezilijentnost metabolizma i laktacije krava na termičke ekološke faktore“. Broj projekta: 142-451-3035/2023-01/01.

U toku sprovođenja projektnih zadataka pri farmi mlečnih krava PIK „Bečej“, odnosno izvođenja snimanja termovizijskom kamerom - Testo 865 (*Testo, Bangkok, Tajland*), kod 3 grla uključena u procese snimanja, ustanovljena je razlika u temperaturi/temperiranosti istih anatomskih područja na susednim ekstremitetima (Tabela 1.). Navedene razlike u temperiranosti ukazivale su naophodnost sprovođenja detaljnijeg kliničkog pregleda radi postavljanja konačne ili presumptivne dijagnoze, a radi sprovođenja daljih dijagnostičkih a potom i terapijskih procedura i protokola.

Kod grla br. 1, a na osnovu kliničkog nalaza (Slika 1, 2; Tabela 1.) i poređenja afektiranog područja zadnjeg desnog ekstremiteta sa istim anatomskim područjem susednog – levog ekstremiteta, može se postaviti presumptivna dijagnoza postojanja tarzalnog artritisa. Za dalju evaluaciju oboljenja, kao i

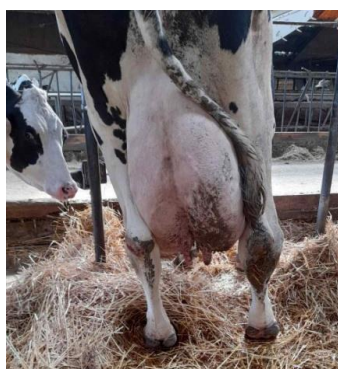
postavljanje konačne dijagnoze, neophodno je sprovesti sledeće dijagnostičke procedure: rendgenološku dijagnostiku i/ili ultrazvučnu dijagnostiku, a potom i probnu punkciju sa laboratorijskom analizom dobijenog sadržaja.

Kod grla br. 2, a na osnovu kliničkog nalaza (Slika 3, 4; Tabela 1.) i poređenja afektiranog područja prednjeg desnog ekstremiteta sa istim anatomskim područjem susednog – levog ekstremiteta, može se postaviti presumptivna dijagnoza postojanja artritisa papčanog zgloba. Za dalju evaluaciju oboljenja, kao i postavljanje konačne dijagnoze, neophodno je sprovesti sledeće dijagnostičke procedure: rendgenološku dijagnostiku i/ili ultrazvučnu dijagnostiku, a potom i probnu punkciju sa laboratorijskom analizom dobijenog sadržaja.

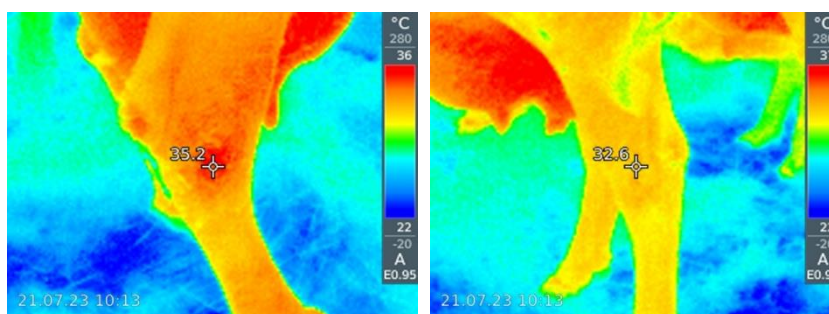
Kod grla br. 3, a na osnovu kliničkog nalaza (Slika 5, 6; Tabela 1.) i poređenja afektiranog područja prednjeg levog ekstremiteta sa istim anatomskim područjem susednog – desnog ekstremiteta, može se postaviti presumptivna dijagnoza postojanja karpalnog higroma. Za dalju evaluaciju oboljenja, kao i postavljanje konačne dijagnoze, neophodno je sprovesti ultrazvučnu dijagnostiku, a potom i probnu punkciju sa laboratorijskom analizom dobijenog sadržaja.

Tabela 1. Razlike u temperiranosti istih anatomskih područja na susednim ekstremitetima kod 3 različita grla

Redni br. grla	Anatomsko područje	Razlika u temperiranosti sa susednim ekstremitetom izmerena termovizijskom kamerom	Klinički nalaz – metode adspekcije i palpacije	Diferencijalne dijagnoze
1.	Skočni zglob zadnje desne noge	2,6 °C	Temperirana oteklina sa lateralne i medijalne strane skočnog zgloba, sa prisutnim oštećenje kože.	Tarzalni artritis, tarzalni higrom
2.	Kruna papka prednje desne noge	7,7 °C	Temperirana oteklina u predelu krune papka, palpatorno izrazito bolna. Nemogućnost oslanjanja/izrazito teško oslanjanje na ekstremitet. Pri ustajanju, životinja celu svoju težinu prebacuje na susedni ekstremitet.	Papčani artritis, artritis krunskog zgloba
3.	Karpalni zglob prednje leve noge	1,1 °C	Bezbolna oteklina sa nemogućnošću manualnog određivanja razlike u temperiranosti između susednih ekstremiteta. Prisutan fenomen fluktuacije.	Karpalni artritis, karpalni higrom



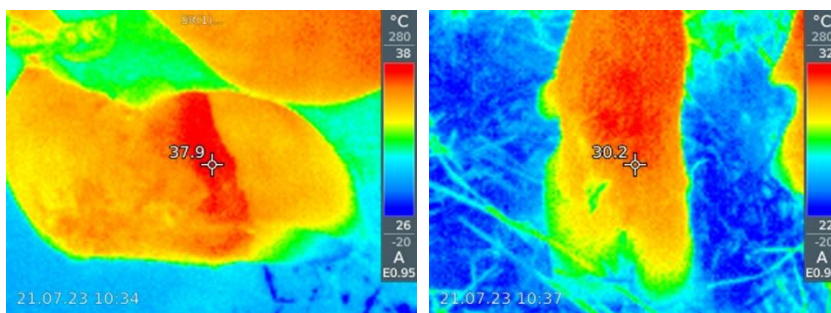
Slika 1. Tarzalni artritis – presumptivna dijagnoza



Slika 2. Direktnim izvođenjem termografije, te poređenjem termograma područja tarzalnih (skočnih) zglobova dva susedna ekstremiteta iste životinje, ustanovljena je razlika u temperiranosti kože afektiranog i neafektiranog područja u vrednosti 2,6 °C.



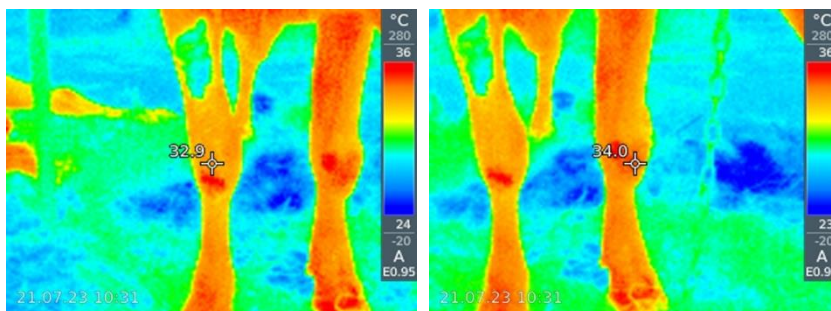
Slika 3. Otok u predelu krune papka



Slika 4. Direktnim izvođenjem termografije, te poređenjem termograma u području krune papaka tarzalnih ustanovljena je razlika u temperiranosti kože afektiranog i neafektiranog područja u vrednosti 7,7 °C.



Slika 5. Karpalni higrom – presumtivna dijagnoza



Slika 6. Direktnim izvođenjem termografije, te poređenjem termograma u području karpalnih zglobova susednih ekstremiteta iste životinje, ustanovljena je razlika u temperiranosti kože afektiranog i neafektiranog područja u vrednosti 1,1 °C.

DISKUSIJA

Kao jedno od najznačajnijih oboljenja ekstremiteta kod goveda, navodi se septični artritis (1). Septični artritis se može javiti direktnom traumom i/ili kontaminacijom zgloba, proširenjem periartikularne infekcije ili hematogenim širenjem (2, 3). U jednom istraživanju, 24% dijagnostikovanih oboljenja kolenog zgloba je uzrokovano septičnim artritisom (4).

Kada je reč o oboljenjima kod goveda, termografija svoju primenu pronalazi pre svega u dijagnostici oboljenja lokomotornog sistema (pre svega oboljenja distalnih delova ekstremiteta – artritisa i oboljenja papaka), zatim dijagnostici oboljenja vimena i kože (5, 6, 7, 8, 9).

Ono što je bitno istaći prilikom izvođenja termografije u dijagnostici artritisa, jeste da se termografija izvodi nakon izvršenog opšteg dela kliničkog pregleda (koji pre svega podrazumeva izvođenje adspekcije i palpacije), a pre izvođenja drugih, specijalnih metoda kliničkog pregleda, kao i da je neophodno izvesti snimanja istih anatomskih područja susednih ekstremiteta jer se postavljanje dijagnoze zasniva na temperaturnoj razlici dobijenih rezultata (6, 7, 8). U ovom prikazu slučaja, termografija je takođe izvedena i nakon opšteg dela kliničkog pregleda, ali su prethodni rezultati dobijenih termograma (kao što je prethodno navedeno u opisu slučaja) bili ključni u započinjanju kliničkog pregleda životinja, jer su ukazivali na postojanje razlika u temperiranosti istih anatomskih područja na susednim ekstremitetima. Istraživanja su pokazala da razlike u temperaturnim vrednostima od 0,5 do 1,5 °C između afektiranog i neafektiranog područja na susednim ekstremitetima, govore u prilog postojanja zapaljenskih procesa, naročito ako postoje i različiti klinički znaci koji govore u prilog postojanja zapaljenskih procesa (6, 8). U našem prikazu slučaja, razlike u temperiranosti između afektiranih i neafektiranih struktura bile su značajne (Tabela 1) i označavale su postojanje zapaljenskih procesa. Neinvazivnost termografije, zatim detektovanje minimalnih temperaturnih variranja poređenjem termograma identičnih struktura susednih ekstremiteta, svrstava termografiju u jednu od najkorisnijih metoda u ranom postavljanju presumptivne

dijagnoze, kada pre svega dolazi do promena u mikrocirkulaciji i povećanju temperiranosti afektiranih struktura, a ne i do kliničkih manifestacija bolesti (5, 6, 7, 8).

Termografijom se mogu otkriti anatomske, topografske i funkcionalne promene, ali ne i tačne lokalizacije samih procesa, kao ni njihova bliža karakterizacija, te je nakon sprovođenja termografije neophodno sprovesti neku od sledećih dijagnostičkih procedura (5, 6, 7, 8), što je potvrđeno i našim istraživanjem: rendgenološka dijagnostika, ultrazvučna dijagnostika, probna punkcija, bakteriološka i citološka analiza sinovijalne tečnosti i dobijenog punktata. Takođe, termografija u mnogome doprinosi daljoj evaluaciji patoloških procesa jer praćenjem vrednosti temperaturnih varijacija pomaže praćenju efekta sprovedenih terapijskih protokola i procedura (5, 6, 7, 8).

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat projekta broj 142-451-3035/2023-01/01, koji je finansiran od strane Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost Vojvodine.

LITERATURA

1. Haerdi-Landerer M.C., Habermacher J., Wenger B., Suter M.M., Steiner A. Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. *The Veterinary Journal*. 2010, 184(1):14-20.
2. Munroe G., Cauvin E. The use of arthroscopy in the treatment of septic arthritis in two highland calves. *British Veterinary Journal*. 1994, 150(5):439-449.
3. Kofler J. Arthrosonography—The use of diagnostic ultrasound in septic and traumatic arthritis in cattle—A retrospective study of 25 patients. *British Veterinary Journal*. 1996, 152(6):683-698.
4. Ducharme NG, Stanton ME, Ducharme GR. Stifle lameness in cattle of 2 veterinary teaching hospitals: A retrospective study of 42 cases. *The Canadian Veterinary Journal*. 1985, 26:212-217.
5. Racewicz P, Sobek J, Majewski M, Różańska-Zawieja J. The use of thermal imaging measurements in dairy cow herds. *Animal Science and Genetics*. 2018, 14(1):55-69.
6. Arican M, Erol H, Altan SEMİH, Köylü Ö. The use of infrared thermography in the early diagnosis of septic arthritis in calves. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2022, 25(2):298-307.
7. Yanmaz LE, Dogan E, Okumus Z, Mahir KAYA, Senocak MG, Cengiz S. Radiographic, ultrasonographic and thermographic findings in neonatal calves with septic arthritis: 82 cases (2006-2013). *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2016, 11(1):6-12.
8. Alsaaod M, Schaefer AL, Büscher W, Steiner A. The role of infrared thermography as a non-invasive tool for the detection of lameness in cattle. *Sensors*. 2015, 15(6): 14513-14525.
9. Džermeikaitė K., Bačėninaitė D., Antanaitis, R. *Innovations in Cattle Farming: Application of Innovative Technologies and Sensors in the Diagnosis of Diseases*. *Animals*. 2023, 13(5):780.

**UTICAJ RAZLIČITIH RASA NERASTOVA NA
KVALITETE EJAKULATA**
*THE INFLUENCE OF BOAR BREED ON
EJACULATE QUALITY*

**Igor Zdraveski^{a*}, Petar Dodovski^a, Pance Dameski^a, Natasa Pejcinovska^a,
Nikola Karabolovski^a, Taliya Hristovska^a, Mimi Ristevski^a**

^a*Veterinaren fakultet – Bitola, Univerzitet “Sv. Kliment Ohridski” – Bitola, Prilepska
bb, Bitola 7000, Severna Makedonija*

^a*Veterinary faculty – Bitola, University “Sv. Kliment Ohridski” – Bitola, Prilepska bb,
Bitola 7000, North Macedonia*

**Autor za kontakt: igor.zdraveski@uklo.edu.mk*

SAŽETAK

Rezultati istraživanja u ovom radu pokazali su da rasa duroc u odnosu na jorkšir i landras rasu, ima manji volumen ejakulata ali je kod ove rase utvrđena najveća progresivna pokretljivost i koncentracija spermatozoida kao i najveći procenat proteina u spermalnoj plazmi, a sa druge strane najmanji ukupan broj spermatozoida. Ovi rezultati vrlo konkretno pokazuju da postoje značajne razlike u vrednostima osnovnih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, između pojedinih rasa nerastova i da genetski potencijal rase utiče na parametre ejakulata, a time i na fertilitet samog ejakulata.

Ključne reči: ejakulat, spermatozoidi, nerastovi

ABSTRACT

Research results in this paper showed that the duroc breed, compared to yorkshire and landrace, has a smaller ejaculate volume, but the highest progressive motility and concentration of spermatozoa, as well as the highest percentage of protein in the sperm plasma were determined, and on the other hand, the lowest total number of spermatozoa. These results very concretely show the significant differences in values of basic fertilization potential parameters of the ejaculate, between boar breeds and that the genetic potential of the breed affects the ejaculate parameters, thus the fertility of the ejaculate itself.

Key words: ejaculate, spermatozoa, boars

UVOD

Na parametre ejakulata nerasta utiče veći broj genetskih i paragenetskih faktora. Ipak treba napomenuti da su osobine ejakulata nerasta nisko nasledne, tako da je varijabilnost ovih osobina u velikoj meri uslovljena različitim paragenetskim faktorima. Neki uticaji, kao što su neadekvatna ishrana, visoka ambijentalna temperatura i starenje životinje imaju negativan efekat na produkciju sperme (1). Istraživanja koja su radili i rezultati koji su dobili ovi autori pokazali su značajan uticaj starosti, sezone, interakcije starost-rasa i sezona-rasa na morfološke karakteristike i vitalnost sperme (1). Dakle, kako navode *Smital i sar.* (2), istraživanja brojnih autora jasno pokazuju da razlike u fertilitetu nerastova više zavise od genetskih nego od

paragenetskih (spoljašnjih) faktora. Otkrivanje tih razlika između pojedinih nerastova je od velike važnosti za proizvodnju svinja, jer nerastovi imaju veliki uticaj na reproduktivnu performansu zapata, naročito ako se radi o primeni veštačkog osemenjavanja (3). Iako na parametre ejakulata nerasta utiče veći broj genetskih i paragenetskih faktora, ipak se, u ovom pogledu, ističu frekvencija uzimanja sperme, rasa, starost nerasta i godišnja sezona (4,5).

Rasa ima značajni uticaj na osnovne parametre sperme nerasta i signifikantno ($p < 0,001$) utiče na volumen ejakulata, koncentraciju spermatozoida u 1ml ejakulata, kao i na postotak morfološki promenjenih spermatozoida u ejakulatu (6) (Tabela br.1).

Tabela 1. Parametri ejakulata nekih rasa nerastova (*Katanić, 2004*)

Parametri	Rasa nerastova				Prosek (n=287)
	D (n=39)	H (n=32)	VJ (n=54)	ŠL (n=44)	
Volumen (ml)	183	303	275	292	256
Ukupan broj spermatozoida ($\times 10^9$)	39	53	52	55	50
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$)	244	181	193	191	204
Prog. pokretljivost (%)	73	81	78	75	77
Ukupno prog. pokretnih spermatozoida ($\times 10^9$)	28.5	42.9	40.6	41.3	38.7

D-durok; H-hempšir; VJ-veliki jorkšir; SL-švedski landras.

Nije utvrđena značajna razlika u procentu progresivne pokretljivosti spermatozoida između rasa durok i danski landras (6), što su takođe utvrdili i *Jankevičiūtė i Žilinskas* (7) u svojim ispitivanjima.

U istraživanja koja su radili *Wolf i Smital* (8), ustanovili su da nerastovi rase durok (D) imaju najmanji volumen ejakulata (200 mL), ali i najveću prosečnu koncentraciju spermatozoida 491×10^3 spermatozoida po (mL) u odnosu na ostale čistorasne nerastove i meleze. Kod nerastova rase veliki jorkšir, prosečan volumen je bio 270 mL, a prosečna koncentracija je bila 461×10^3 spermatozoida po mm^3 . *Smital* (9) je

ustanovio signifikantne razlike u volumenu (V), koncentraciji spermatozoida (Ko), progresivnoj pokretljivosti (Pp), procentu abnormalnih spermatozoida (As) i ukupnom broju spermatozoida (Ub). Maksimalne razlike između pojedinih parametara ejakulata između rasa su bile 95 mL za V, $109 \times 10^3 \text{ mm}^3$ za Ko, 9 % za Pp, 1,6 % za As i 24×10^9 za Ub. Maksimalni heterozis efekat je postignut 12% za V, 17% za Ko, 4% za Pp, 14% za As i 8% za Ub. *Ciereszko i sar.* (11) ustanovili su da postoji signifikantna razlika ($p < 0,01$) između nerastova rase veliki jorkšir i pietren u volumenu ejakulata (266 mL prema 158 mL), koncentraciji spermatozoida

(373×10^6 /mL prema 548×10^6 / mL) i ukupnog broja spermatozoida u ejakulatu (95×10^9 prema 85×10^9). *Kommisurd i sar.* (11) pronašli su da prosečan volumen ejakulata nerastova rase durok iznosi 147 mL, rase landras 265 mL i rase veliki jorkšir 245 mL.

U istraživanju koje su sproveli *Stančić i sar.* (5) prijavljeno je da se najveći volumen (303 mL) i najniža koncentracija spermatozoida (181×10^6 /mL), beleži kod nerastova rase hempšir, dok je najmanji volumen utvrđen kod nerasta rase pijetren (177 mL), a najveća koncentracija spermatozoida kod nerasta rase durok (218×10^6 po mL), kod koga je volumen ejakulata bio niži od proseka svih ispitivanih nerastova (191 mL prema 262 mL). Isti autori (5) u istraživanju utvrdili su da je prosečna pokretljivost spermatozoida bila 78%, pri čemu je najniža zabeležena kod nerasta rase durok (75%), a najviša kod nerasta rase pijetren (83%). Od 182 analizirana ejakulata, progresivna pokretljivost niža od 65% ustanovljena je kod 12,6% ispitanih ejakulata (5). Najveći broj takvih ejakulata sa progresivnom pokretljivošću nižom od 65% ustanovljeno je kod 22,7% nerastova meleza F1 i kod 17,6% nerasta švedskog landrasa (5). Takvi su ejakulati, prema navodima autora (5), neprihvatljivi za pripremu doza za veštačko osemenjivanje.

Rezultati dobijeni iz mnogobrojnih istraživanja pokazuju da postoje značajne razlike u vrednostima osnovnih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, između pojedinih rasa nerastova. Ove razlike bi trebalo iskoristiti u selekcijskim programima za povećanje fertiliteta sperme nerastova (2).

MATERIJAL I METOD

Ejakulati su uzeti od ukupno 47 nerastova, sa ukupno 9 farmi. Ejakulati su uzimani uobičajenom metodom manuelne fiksacije penisa i skokom nerasta na fantom. Uziman je ejakulat bez gel-frakcije. Oprema koja je korištena prilikom uzimanja sperme (rukavice, polietilenski spermosabirač, filter-gaza), bila je sterilna i za jednokratnu upotrebu. Volumen dobijenog ejakulata je izmeren na farmi, a uzorak ejakulata, oko 60-70 ml je stavljen u sterilnu polietilensku flašicu za spermu. Ovako

pripremljeni uzorci, stavljeni su u termo-boks na temperaturu od $+17^{\circ}\text{C}$ i transportovani od farme do laboratorije za reprodukciju na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Uzorci ejakulata obeležani su osnovnim podacima identifikacije (broj tetovir nerasta) i uz propratnu dokumentaciju (ime farme, datum uzimanja uzorka, volumen uzorka, starost i rasa nerasta) su dostavljeni do laboratorije u periodu od 2 do 4 sata nakon uzorkovanja. U laboratoriji, uzorci ejakulata su stavljeni u vodeno kupatilo na $+37^{\circ}\text{C}$ u periodu od 60 minuta uz postepeno zagrevanje. Na ovoj temperaturi, uzorci su držani tokom kontrole kvaliteta. Kontrola kvaliteta vršena je makroskopska ocena ejakulata i tako i mikroskopska analiza koja uključuje određivanje osnovnih parametara fertilizacionog potencijala svakog uzorka.

Makroskopska ocena je obuhvatila volumena ejakulata(koji je određen na farmi), a pored toga i izgled, boju, gustinu, prisustvo stranih materija (nečistoća, krv i gnoj).

Mikroskopska ocenativne sperme je obuhvatila: određivanje progresivne pokretljivosti (%), koncentracije spermatozoida ($\times 10^6$ u jednom ml ejakulata) i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$).

Vizuelnom mikroskopskom metodom (faznokontrastni mikroskop, uveličanje $100\times$) uz konstantno održavanje temperature (37°C) na predmetnoj pločici i ljuspici, određivana je progresivna pokretljivost svakog uzorka. Da bi se dobilo šest vrednosti ocene progresivne pokretljivosti za svaki uzorak ejakulata, ocenu ovog parametra vršila su dva iskusna istraživača, istovremeno ali nezavisno, u 3 različita vidna polja mikroskopa i u dve različite kapi sperme (*Komisurd i sar.*, 2002). Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6$ u jednom ml ejakulata) i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu ($\times 10^9$), određeni su fotometrijskom metodom, primenom digitalnog fotometra SDM-5 (Minitüb, Tifenbach, Germany). Dobijeni rezultati su uredno evidentirani za svaki uzorak native sperme.

U cilju dobijanja spermalne plazme svaki uzorak (20ml svežeg ejakulata) je centrifugiran na 1000 o/min na temperaturi 4°C , tokom 15 minuta, kako bi se razdvojili spermatozoidi i spermalna plazma. Nakon centrifugiranja

supernatant (semena plazma) je odliven u epruvetu i ponovo centrifugiran na 3000 o/min. na 4°C, kako bi se spermalna plazma prečisti od eventualno zaostalih spermatozoida ili drugih organskih partikula. Tako dobijeni uzorci spermalne plazme su čuvani maksimalno 24h u frižideru na 4°C, do momenta početka hemijske analize.

Analiza sadržaja proteina u spermalnoj plazmi rađena je metodom AOAC (Official Method 2001.11).

U ovo istraživanje izvršeno je ispitivanje kvaliteta ukupno 47 ejakulata od 47 nerasta. Za ispitivanje su uzete tri rase nerasta, koje se najčešće koriste u industrijskoj proizvodnji svinja na vojvođanskim farmama: landras, jorkšir i durok. Rasa nerasta, broj ispitivanih nerasta i broj ejakulata po nerastu prikazani su u tabeli 2.

Tabela br 2. Broj ispitivanih ejakulata po rasama

Parametri	Rasa			Ukupno
	Landras	Jokšir	Durok	
Broj nerastova / ejakulata (n)	16	22	9	47

Parametri za sve tri rase analizirani su kao kategoriski varijabilne. Analizirano je ukupno 47 ejakulata od 47 nerasta sa devet farmi. Analizirani su: volumen ejakulata nerastova (manji od 119ml i veći od 120ml), % progresivna pokretljivost (manja od 64% i veća od 65%), koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$) (manja od 199 i veća od 200) i sadržaj

ukupnih proteina u spermalnoj plazmi (manji od 3%, od 3% do 3,5% i veći od 3,6%). Broj nerastova prema kategoriji ispitivanih parametara ejakulata (volumen ejakulata, progresivna pokretljivost, koncentracija spermatozoida i procenat ukupnih proteina) kod pojedinih rasa nerastova (landras, jokšir i durok) prikazan je u tabeli br. 3.

Tabela br 3. Parametri kvaliteta nativnih ejakulata nerastova po rasama određeni su fotometrijskom metodom, primenom digitalnog fotometra SDM-5 (Minitüb, Tifenbach, Germany).

Parametri		Rasa			Ukupno
		Landras	Jokšir	Durok	
		(n)	(n)	(n)	
Volumen (ml)	<119	0	2	3	5
	>120	16	20	6	42
Progresivnapokretljivost (%)	< 64	5	7	1	13
	> 65	11	15	8	34
Koncentracija spermatozoida ($\times 10^6/\text{ml}$ ejakulata)	< 199	5	3	1	9
	> 200	11	18	8	37
Proteini (%)	< 3	13	11	5	29
	3 – 3.5	0	7	1	8
	> 3.6	3	4	3	10

Statistička analiza dobijenih podataka tokom istraživanja obrađena je u statističkom programu SPSS 17,0. Kategorijski parametri su prikazani apsolutnim i relativnim brojevima. Kvantitativne varijable su prikazane u proseku, minimalne vrednosti, maksimalne vrednosti i standardna devijacija. Za poređenje parametara koji su bili analizirani korišćenisu Studentov *t*-test, Analysis of Variance, Kruskal Wallis test, Fisher exact, two tailed test, a za analiziranje korelacija između parametara korišćen Pearsonov (*r*) koeficijent linearne korelacije. Statistička signifikantnost definisana je na nivo na $p < 0.05$.

REZULTATI

Rezultati i ukupne vrednosti osnovnih parametara ejakulata nerastova rase landras ($n=16$), jorkšir ($n=22$) i durok ($n=9$) ispitane na svih devet farmi, prikazane su u tabeli 4 i grafikonima 7 i 8. Ukupno je ispitivano 47 nerastova, od kojih je uzet po jedan ejakulat odnosnoukupno 47 ejakulata.

U tabeli br. 4 i grafikonu br. 7, rezultati istraživanja pokazuju nesignifikantno različite vrednosti u volumenu ejakulata između tri analizirane rase nerastova ($p=0,5$). Najveći volumen ejakulata u proseku je bio izmeren kod nerastova rase jorkšir (222 ± 83), dok je najmanji kod rase durok (184 ± 85), ali razlika od 38 ml nije bila statistički značajna.

Nerastovi rase landras su imali nesignifikantno nižu progresivnu pokretljivost spermatozoida (68 ± 17), u odnosu na nerastove rase jorkšir (72 ± 17) i rase durok (73 ± 25) ($p=0,69$).

Između nerastova rase landras, jorkšir i durok, nije postojala statistički signifikantna razlika u koncentraciji spermatozoida ($p=0,9$).

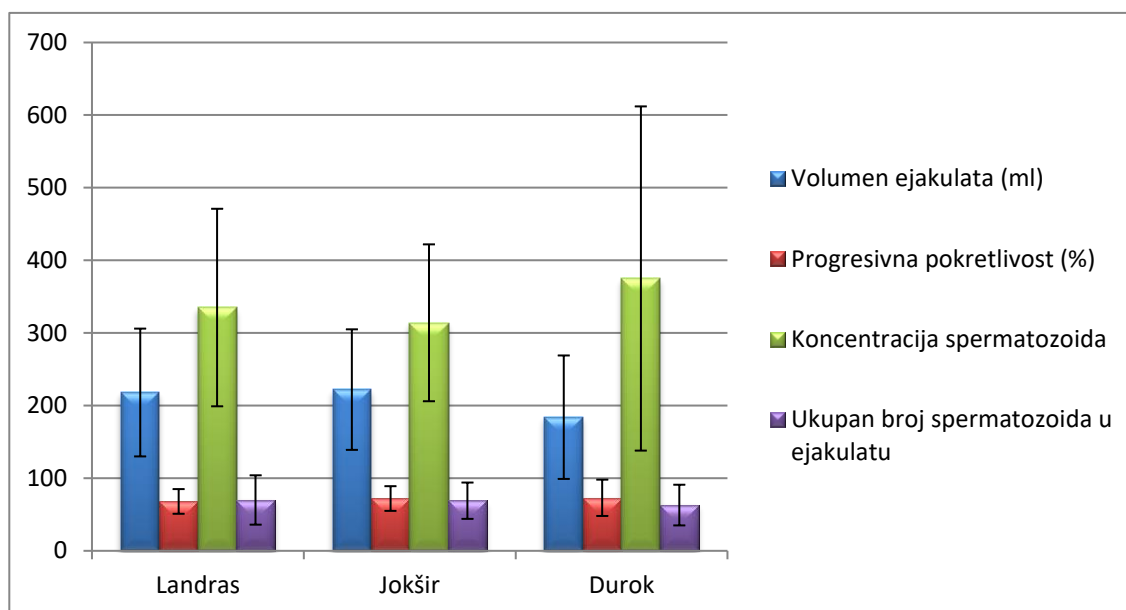
Ukupan broj spermatozoida u proseku je bio najveći kod nerastova rase landras ($70 \times 10^9 \pm 34$), zatim rase jorkšir ($69 \pm 25 \times 10^9$) i rase durok ($63 \pm 28 \times 10^9$), ali razlike između nerastova ovih rasa u odnosu na ukupni broj spermatozoida statistički nisu bili signifikantni ($p=0,85$).

Statistički nesignifikantne razlike ($p=0,42$) utvrđene su i analizom vrednosti procenatualne zastupljenosti ukupnih proteina u ejakulatu kod nerastova rase durok ($2,93 \pm 0,9$), zatim kod rase jorkšir ($2,85 \pm 0,8$), i rase landras ($2,51 \pm 1,0$), tabela br. 4 i grafikon br.1).

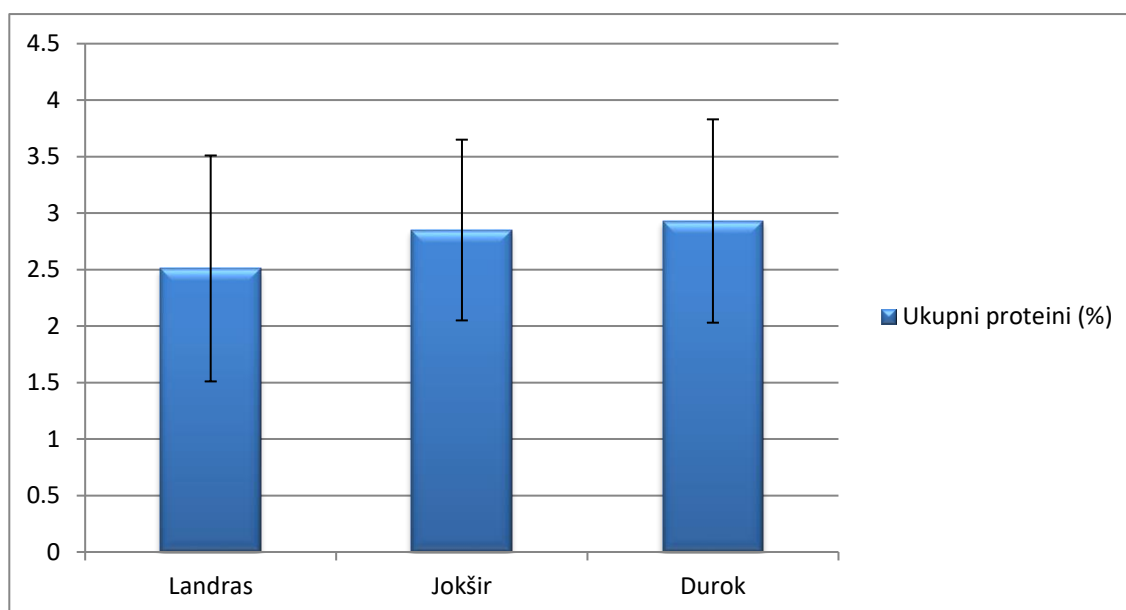
Tabela 4. Parametri kvaliteta nativnih ejakulata nerastova po rasama.

Parametri	Rasa			P value
	Landras	Jokšir	Durok	
Broj nerastova/ ejakulata/ (n)	16	22	9	/
Volumen ejakulata (ml)	218 $\pm$ 88 130-420	222 $\pm$ 83 50-390	184 $\pm$ 85 70-320	P = 0,5
Progresivna pokretljivost (%)	68 $\pm$ 17 30-90	72 $\pm$ 17 35-90	73 $\pm$ 25 10-95	P = 0,69
Koncentracija spermatozoida x 10 ⁶	335 $\pm$ 136 176-636	314 $\pm$ 108 84-579	375 $\pm$ 237 140-965	P = 0,9
Ukupan broj spermatozoida x10 ⁹	70 $\pm$ 34 29-136	69 $\pm$ 25 22-116	63 $\pm$ 28 8-92	P = 0,85
Ukupni proteini, %	2,51 $\pm$ 1,0 1,65-5,34	2,85 $\pm$ 0,8 1,43-4,2	2,93 $\pm$ 0,9 1,73-4,2	P = 0,42
Dobrih ejakulata * (%)	56 16/9	77 22/17	78 9/7	-

*Procenat dobrih ejakulata (%) Volumen ≥ 120 ml; Koncentracija spermatozoida $\geq 200 \times 10^6$ /ml ejakulata; Prog. pokret. $\geq 65\%$.



Grafikon br. 1. Prikaz parametara kvaliteta nativnih ejakulata kod nerastova sve tri rase ($x \pm SD$).NS ; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$



Grafikon br.2. Prikaz procentualne zastupljenosti ukupnih proteina u ejakulatu kod nerastova sve tri rase ($x \pm SD$).NS ; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Kvalitet ejakulata u ovom istraživanju bio je analiziran komparacijom parametara ejakulata između tri najčešće eksploatisanih rasa (durok, landra i jorkšir) u cilju utvrđivanja uticaja genetskih faktora, kao što su rasa, linija i individualnost kod nerasta, na kvalitet ejakulata. Ispitivanje uticaja rase, a time i genetki efekat na parametre ejakulata ispitivao je veliki broj autora (6,5,12). Naše istraživanje obuhvatilo je volumen ejakulata, progresivnu pokretljivost, koncentraciju, ukupan broj spermatozoida i procenat proteina u spermalnoj plazmi, što su opisivali i drugi autori. Najveći volumen ejakulata u proseku je bio izmeren u grupi rase jorkšir ($222\text{ml} \pm 83$), a najniži u grupi rase durok ($184\text{ml} \pm 85$), ali razlika od 38 ml nije bila statistički signifikantna (tabela 4 i grafikon 1). Kod rase landras utvrđen je volumen od 218 ml, s time što su se vrednosti kod pojedinih nerastova ove rase kretale od 130ml (minimalni) volumena do 420ml (maksimalno) volumena. *Apić* (13), u svojoj doktorskoj disertaciji utvrdila je maksimalni volumen kod rase landras (301 ml), dok je minimalni volumen bio kod rase durok (228 ml). *Kommisur d i sar.* (11) nalaze da prosečan volumen ejakulata nerastova rase durok iznosi 147 ml, rase landras 265 ml i rase jorkšir 245 ml, dok *Johnson i sar.* (14), nalaze da je prosečan ejakulat rase durok iznosio 170 ml, rase landras 252 ml, a rase jorkšir 243 ml. Slični rezultati volumena ejakulata dobijeni su i u ovom istraživanju, s time da razlika volumena između pojedinih rasa nerastova nije bila statistički značajna, ali analizom volumena po kategorijama (kategorije sa manjim volumenom ejakulata od 119ml i većim od 120ml) rezultati su pokazali značajne razlike između analiziranih rasa nerastova. Ovi rezultati su u saglasnosti sa *Wolf i Smital* (8), koji su ustanovili da je prosečan volumen ejakulata nerastova rase durok (200 ml) značajno manji od nerastova rase jorkšir (270 ml). Prema tome, može se reći da rasa landras ima najveći volumen ejakulata, dok rasa nerastova durok ima najmanji volumen ejakulata. Razlike u volumenu i kvalitetu ejakulata mogu biti i posledica namene rasa u odgajivačkom programu. Upravo, inferiornost izrazito mesnate rase durok u volumenu ejakulata (ne i u produkciji sperme) u odnosu na plodne rase,

možda je posledica selekcije u pravcu visoke proizvodnje mesa, a moguće i da je u pitanju manja brojnost populacije koja je zahtevala niži intenzitet selekcije. Neka istraživanja ukazuju na mogući poremećaj funkcija akcesornih polnih žlezda, kada su u pitanju genotipovi sa izrazito malim volumenom ejakulata. S obzirom na kompleksnost reproduktivnog mehanizma, najverovatnije je da je u pitanju niz genetskih i hormonalnih uticaja.

Prema našim rezultatima, utvrđena je nesignifikantno najveća progresivna pokretljivost spermatozoida kod nerastova rase durok koja je iznosila 73%, u odnosu na nerastove rase landras i jorkšir. Od ukupno ispitanih nerastova, rasa durok (89%) nalazi se u kategoriji sa većim procentom pokretljivosti spermatozoida (65% progresivne pokretljivosti). Progresivna pokretljivost kod nerastova rase landras bila je 68%, s time da su 69% ispitanih ejakulata imali progresivnu pokretljivost iznad 65%, dok je kod rase jorkšir progresivna pokretljivost u proseku iznosila 72%, a od ukupnog broja ispitanih ejakulata 68% imali su pokretljivost veću od 65% (tabela br. 4). Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima progresivne pokretljivosti spermatozoida koje je prijavljuje *Apić* (13) u svom istraživanju. Autor (13) je takođe utvrdio da je najveća progresivna pokretljivost kod rase durok (82%), dok je kod nerastova rase jorkšir najmanja progresivna pokretljivost spermatozoida (77%). Suprotno ovim rezultatima, *Borg i sar.* (15) nisu utvrdili uticaj rase nerasta na progresivnu pokretljivost i morfološke osobine sperme. Sa druge strane, smatralo se da je pokretljivost najvažnija osobina koja utiče na fertilizacioni kapacitet spermatozoida (16), a ocena pokretljivosti spermatozoida je najvažniji parametar sperme (17).

Koncentracija spermatozoida između analiziranih rasa nije bila statistički značajna, ali ipak rezultati pokazuju da rasa durok ima najveću koncentraciju spermatozoida, u odnosu na ostale ispitivane rase, kao i najmanji broj spermatozoida u ejakulatu. Najmanja koncentracija spermatozoida utvrđena je kod rase jorkšir, dok je najveći broj spermatozoida utvrđen kod rase landras. Ovi rezultati su u saglasnost sa rezultatima *Jankevičiūtė i Žilinskas* (18) koji su utvrdili da je manja koncentracija spermatozoida ($470 \times 10^6/\text{ml}$) kod rase landras u

odnosu na durok rasu ($540 \times 10^6/\text{ml}$).

Veliki broj istraživanja su pokazala da nivo proteina u spermalnoj plazmi nije u visokoj korelaciji sa rasom nerasta (13,19,20) ali dokazane su varijacije između jedinke unutar pojedine rase. (21,22). Slični rezultati dobijeni su i u ovom istraživanju, pa se tako procentualne razlike zastupljenosti proteina nisu razlikovale značajno. Ipak kod rase durok utvrđen je najveći procenat proteina, u odnosu na rasu jokšir i landras. Kod nerastova rase landras utvrđen je najmanji procenat proteina spermalne plazme.

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su da rasa durok ima najmanji volumen ejakulata, ali i ima najveću progresivnu pokretljivost i koncentraciju spermatozoida, kao i najveći procenat proteina u spermalnoj plazmi, dok je ukupan broj spermatozoida bio najmanji. Ovi rezultati kao i rezultati do kojih su došli drugi autori, vrlo konkretno pokazuju da postoje značajne razlike u vrednostima osnovnih parametara fertilizacionog potencijala ejakulata, između pojedinih rasa nerastova i da genetski potencijal rase utiče na parametre ejakulata, a time i fertilitet ejakulata.

LITERATURA

1. Šerniene L., Riškevičiene V., Banys A., Žilinskas H. Effects of age, and season on sperm qualitative parameters in lithuanian white and petren boars. *Veter. ir Zoot.* 2002;17(39).
2. Smital J., De Sousa L.L., Mohsen A. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Animal reproduction science.* 2004 Jan 1;80(1-2):121-30.
3. Juonala T., Lintukangas S., Nurttila T., Andersson M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. *Reproduction in Domestic Animals.* 1998 Jun;33(3-4):155-8
4. Colenbrander B., Kemp B. Factors influencing semen quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1990(Supplement No. 40):105-15.
5. Stančić B.L., Gagrčin M., Radović I. Effect of season, breed and age on the quality of boar sperm 1: The native sperm. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 2003;19(1-2):17-23.
6. Katanić N. *Fertilizacioni kapacitet native i razređene sperme nerastova (Magistarska teza)* (2004). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
7. Jankevičiūtė N., Žilinskas H. Influence of some factors on semen quality of different breeds of boars. *Veterinarija ir zootechnika.* 2002;19(41):15-9.
8. Wolf J., Smital J. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *Journal of animal science.* 2009b May 1;87(5):1620-7.
9. Smital J. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science.* 2009 Feb 1;110(3-4):335-46.
10. Ciereszko A., Ottobre J.S., Glogowski J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science.* 2000 Dec 1;64(1-2):89-96.
11. Kommisrud E., Paulenz H., Sehested E., Grevle I.S. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2002 Mar;43(1):49.
12. Smital J. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science.* 2009 Feb 1;110(3-4):335-46.
13. Apić J. *Uticaj sadržaja proteina u spermalnoj plazmi nerasta na parametre razređene sperme i fertilitet veštački osemenjenih krmača (Doktorska disertacija)* (2015). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu.
14. Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M. Erratum to "Storage of boar semen":[*Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 143–172]. *Animal reproduction science.* 2000 Dec 1;64(1):133-4.
15. Borg K.E., Lunstra D.D., Christenson R.K. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minzhu boars. *Biology of reproduction.* 1993 Sep 1;49(3):515-21.
16. Feitsma H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. *Acta scientiae veterinariae.* 2009;37(Supl 1):s61-71.
17. Kunowska-Słószarz M.A., Makowska A.N. Effect of breed and season on the boars semen characteristics. *Annals of Warsaw University of Life Sciences–SGGW, Animal Science.* 2011;49:77-86.
18. Jankevičiūtė N., Žilinskas H. Influence of some factors on semen quality of different breeds of boars. *Veterinarija ir zootechnika.* 2002;19(41):15-9.
19. Gerfen R.W., White B.R., Cotta M.A., Wheeler M.B. Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology.* 1994 Feb 1;41(2):461-70.
20. Maxwell W.M., Johnson L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology.* 1999 Dec 1;52(8):1353-62.
21. Flowers W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. Raleigh, NC: Annual swine news. 2001:1-4.
22. Novak S., Ruiz-Sánchez A., Dixon W.T., Foxcroft G.R., Dyck M.K. Seminal plasma proteins as

potential markers of relative fertility in boars. Journal of Andrology. 2010 Mar 4;31(2):188-200.