

**POVEZANOST METABOLIZMA GVOŽĐA, ORGANSKIH MATERIJA I FLEBOTOMIJE SA
ERITROPEZOM PREŽIVARA**

**THE RELATIONSHIP OF THE METABOLISM OF IRON, ORGANIC MATTER AND
PHLEBOTOMY WITH THE ERYTHROPOIESIS OF RUMINANTS**

**Siniša Grubač^{a*}, Marko Cincović^b, Jože Starič^c, Maja Došenović Marinković^d,
Biljana Delić Vujanović^d, Jasna Prodanov Radulović^a**

^aNaučni institute za veterinarstvo Novi Sad, Srbija

^bDepartman za veterinarsku medicinu – Laboratorija za patološku fiziologiju, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

^cVeterinarski fakultet Ljubljana, Slovenija

^dAkademija strukovnih studija Šabac, Srbija

*Autor za korespondenciju: sinisagruba@yahoo.com



S.G. <https://orcid.org/0000-0002-8967-1358>, M.C. <https://orcid.org/0000-0002-5683-8983>, J.S. <https://orcid.org/0000-0002-5156-5277>,
M.D.M. <https://orcid.org/0009-0007-8904-0197>, J.P.R. <https://orcid.org/0000-0002-6116-3271>

SAŽETAK

Eritropeza je process stvaranja crvenih krvnih zrnaca i ona je povezana sa brojnim faktorima u organizmu. Gvožđe je značajno zbog njegove uloge u procesu stvaranja hemoglobina. Pored navedenog gvožđe je indirektni pokazatelj inflamacije i regulisano je na sistemskom i celularnom nivou, pa njegov nedostatak govori o sveukupnom zdravstvenom statusu jedinki. Deficit Fe u organizmu se odvija kroz tri faze. Najpre, u prvoj fazi, dolazi do pražnjenja tkivnih depoa, ali raste njegova ukupna količina u cirkulaciji, potom sledi druga faza ili faza pravog deficita sa opadanjem koncentracije serumskog gvožđa i hemoglobina i treća faza je faza u kojoj se klinički vide znaci deficita gvožđa. Deficit gvožđa remeti sve aspekte eritropoeze. Dakle, prvo se troše rezerve gvožđa, potom sa opadanjem gvožđa koje se transportuje i obavlja funkciju menja se eritropoeza, a kada se dostupnost ovog gvožđa sasvim smanji desiće se anemija usled deficita gvožđa. Veoma veliku ulogu igra i metabolizam lipida u funkcionisanju hematopoeznih matičnih ćelija. Oksidacija masnih kiselina predstavlja glavni katabolički put kojim se proizvodi energija u matičnim hematopoeznim ćelijama. Dugolančane masne kiseline se aktiviraju u citosoli pa se transportnim sistemom transportuju u mitohondrije. U njima se dešava beta oksidacija kroz više poznatih etapa stvarajući acetil koenzim A koji pokreće ciklus trikarboksilnih kiselina. Brisanje gena za regulaciju oksidacije masnih kiselina dovodi matične ćelije hematopoeze do gubitka potencijala da se rekonstruišu i održe. Zbog značaja lipolize kod preživara i činjenice da se matične ćelije nalaze u nišama koštane srži koje su bogate lipidima, razmotrićemo i vezu između adipocita koštane srži i hematopoeze. Hronična flebotomija kod ovnova ili nedostatak Fe usled inflamacije i masne jetre kod krava dovode do specifičnih promena u crvenoj krvnoj lozi i metabolizmu organskih materija. Sve navedeno pokazuje da je potrebno poznavati metaboličke tokove kako bi se bolje shvatila eritropoeza kod preživara.

Ključne reči: preživari, eritropoeza, flebotomija, peripartalni period, metabolizam.

ABSTRACT

Erythropoiesis is the process of making red blood cells and it is related to numerous factors in the body. Iron is important because of its role in the process of making hemoglobin. In addition to the mentioned iron, it is an indirect indicator of inflammation and is regulated at the systemic and cellular level, so its lack speaks of the overall health status of individuals. Fe deficiency in the body takes place through three phases. In the first phase, there is emptying of tissue depots, but its total amount in the circulation increases, then follows the

second phase or the phase of real deficit with decreasing concentration of serum iron and hemoglobin, and the third phase is the phase in which the significance of iron deficit is clinically seen. Iron deficiency disrupts all aspects of erythropoiesis. Therefore, first the iron reserves are used up, then with the decrease of transported iron, erythropoiesis changes, and when the availability of this iron is completely reduced, anemia will occur due to iron deficiency. Lipid metabolism also plays a very important role in the functioning of hematopoietic stem cells. Fatty acid oxidation is the main catabolic pathway by which energy is produced in hematopoietic stem cells. Long-chain fatty acids are activated in the cytosol and transported to the mitochondria by the transport system. In them, beta oxidation takes place through several known stages, creating acetyl coenzyme A, which starts the cycle of tricarboxylic acids. Deletion of the gene for regulation of fatty acid oxidation causes hematopoiesis stem cells to lose their potential to reconstruct and maintain themselves. Due to the importance of lipolysis in ruminants and the fact that stem cells are found in the lipid-rich niches of bone marrow, we will also consider the relationship between bone marrow adipocytes and hematopoiesis. Chronic phlebotomy in rams or Fe deficiency due to inflammation and fatty liver in cows lead to specific changes in red blood cell and blood metabolites. All of the above shows that it is necessary to know the metabolic flows in order to better understand erythropoiesis in ruminants.

Key words: ruminants, erythropoiesis, phlebotomy, periparturient period, metabolism.

METABOLIZAM ORGANSKIH I NEORGANSKIH MATERIJA I NJIHOV UTICAJ NA HEMATOPOEZU

Metabolizam organskih i neorganskih materija kod preživara pokazuje određene specifičnosti jer se radi o životinjama sa višekomornim želucem. Višekomorni želudac i kombinacija mikrobiološkog varenja u buragu i enzimatskog varenja u ostalim digestivnim partijama daje prednost kroz korišćenje biljne hrane, koja nije svarljiva za monogastrične životinje.

Gvožđe i druge mineralne materije imaju veliku ulogu u procesu hematopoeze (1,2). Gvožđe je značajno pre svega zbog njegove uloge u eritropoezi i procesu stvaranja hemoglobina. Pored navedenog gvožđe je indirektni pokazatelj inflamacije i regulisano je na sistemskom i celularnom nivou, pa njegov nedostatak govori o sveukupnom zdravstvenom statusu jedinki. Gvožđe kao mikro odnosno oligoelement ima glavnu ulogu u procesu transporta kiseonika, ali je i kofaktor mnogih drugih proteina. On prelaskom iz fero u feri oblik. Gvožđe može biti veoma toksično zbog njegove sposobnosti da veoma brzo razmenjuje elektrone, što dovodi do oksidativnog stresa pa i oksidativnog oštećenja organizma. Da bi se ova njegova osobina a samim tim i toksičnost držala pod kontrolom gvožđe se transportuje vezano za proteine, a i skladišti se kao proteinski kompleks. Veoma mala količina gvožđa na nivou 0,1% se nalazi slobodno u cirkulaciji. Više od četiri petina gvožđa se koristi za eritropoezu od strane

eritroblasta, dok se preostala petina nalazi u mišićnom tkivu, imunološkim ćelijama i funkcionalnim enzimima. Gvožđe je veoma značajno u obezbeđivanju energije, jer učestvuje u stvaranju ATP u respiratornom lancu mitohondrija. Gvožđe ima veliku ulogu u procesu ćelijske deobe i rasta, kao i u procesu sinteze DNK.

Metabolizam gvožđa ima svoje specifičnosti zbog njegove velike reaktivnosti (3-6). Gvožđe se apsorbuje kao hemo gvožđe ili ne-hem gvožđe. Posle apsorpcije gvožđe u cirkulaciji može biti slobodno ili vezano za transferin. Mehanizam prenosa slobodnog gvožđa se i dalje izučava i smatra se da je ono prisutno u formi Fe-citrata ili Fe-acetata. Transferin je protein iz grupe beta 1 globulina i u cirkulaciji ga ima kao transferina bez vezanog gvožđa (apotransferin), transferin sa vezanim jednim atomom gvožđa (monotransferin) i transferin koji vezuje dva atoma gvožđa (di- ili holo-transferin). Fina ravnoteža između ove tri grupe proteina omogućuje da se spreče toksični efekti gvožđa. Da bi se gvožđe koristilo dalje u organizmu, potrebno je da se transferin zakači na transferinske receptore na površini ćelija. Taj receptor (TFR-1 receptor) preuzima transferin-gvožđe kompleks koji ulazi endocitozom u ćeliju, da bi se potom gvožđe oslobodilo, a transferin zajedno sa receptorom biva vraćen na površinu ćelije i otpušten u cirkulaciju da dalje obavlja svoju ulogu u transportu gvožđa. Kada gvožđe izađe iz endozoma ono može biti uskladišteno u sastavu proteina feritina, može da se koriste za metaboličke potrebe kao što je recimo sinteza hema ili može da izađe iz

ćelije preko transporta sa feroportinom 1. Skladištenje gvožđa u ćelijama se vrši najviše u jetri i ćelijama kao što su monociti i makrofagi. Skladištenje se vrši preko feritina, koji nastaje kada se gvožđe veže za apoferitin. Feroportin 1 koji služi za transport gvožđa regulisan je peptidnim hormonom koji se zove hepcidin. Hepcidin tako omogućuje da gvožđe izađe iz ćelija, pa tako i iz enterocita ili makrofaga. Regulacija gvožđa se dodatno vrši i na subćelijskom nivou, pa su tako otkriveni geni značajni za metabolizam proteina i to DMT1 gen za ekspresiju DMT1 transportera, SLC40A1 gen za ekspresiju FPN1 transportera gvožđa iz ćelije) i TFR2 gen za ekspresiju proteinskog takozvanog senzora za gvožđe.

Prilikom gubitka krvi bilo da je u pitanju krvarenje ili hronična flebotomija možemo očekivati deficit gvožđa (7-11). Pored ovoga deficit se prirodno javlja kod jedinki u prvim nedeljama života, a biva potencirana kada se životinje hrane isključivo majčinim mlekom koje je po prirodi siromašno gvožđem. Kod deficita gvožđa treba reći da je ono najčešće uzrokovano velikim gubitkom, mnogo češće nego neadekvatnim unosom. Taj gubitak se najčešće vezuje za gubitak krvi, jer je kao što smo ranije naveli ekskrecija gvožđa vrlo mala i strogo je regulisana na svim nivoima. U organizmu ima dovoljno zaliha Fe koja se lako nadoknađuju usled manjih krvarenja, pa je za nastanak deficita Fe preuslov razvoj obimnijeg krvarenja. Deficit Fe u organizmu se odvija kroz tri faze. Najpre, u prvoj fazi, dolazi do pražnjenja tkivnih depoa, ali raste njegova ukupna količina u cirkulaciji, potom sledi druga faza ili faza pravog deficita sa opadanjem koncentracije serumskog gvožđa i hemoglobina i treća faza je faza u kojoj se klinički vide znaci deficita gvožđa. Klinički vidljivi znaci daju sliku opšteg umora i obamrlosti jedinke zbog manjka gvožđa te izostanka adekvatne sinteze energije odnosno ATP-a. Dodatno na apatiju može uticati i povećana proizvodnja serotonina u CNS-u, jer se smanjeno stvaraju enzimi koji ga razgrađuju, a koji u svom sastavu imaju i gvožđe. Nedostatak gvožđa smanjuje i imunološku kompetenciju jedinke, jer polimorfonukleari posle endocitoze ne mogu da ubiju unešene bakterije, obzirom da im fale enzimi koji u svom sastavu imaju gvožđe. Nađena je i smanjena svarljivost hrane zbog smanjene sekrecije enzima u digestivnom traktu. Najpre troše rezerve gvožđa, potom sa opadanjem gvožđa koje se transportuje i obavlja funkciju menja se eritropoeza, a kada se dostupnost ovog gvožđa sasvim smanji

desiće se anemija usled deficita gvožđa. U našem ogledu čije ćemo rezultate predstaviti na kraju očekujemo da se razvije nalaz koji se nalazi na nivou stadijuma dva (iron depletion), odnosno da se u određenoj meri kompromituje hematopoeza (nivo 3), a da samo kod pojedinih ovnova dođe do eventualnog razvoja anemije. Razlog je taj što planiramo hroničnu, ali kontrolisanu flebotomiju, kako ne bi poremetili generalnu dobrobit životinja. Da bismo razumeli i kako je metabolizam gvožđa povezan sa opštim metaboličkim adaptacijama koristićemo i krave u ranoj laktaciji, koje će biti u klasičnoj homeorezi, a nad kojima nećemo vršiti flebotomiju. Ozirom da se očekuju blaže promene u dijagnostici izmenjenog statusa gvožđa koristićemo osim koncentracije gvožđa i parametre kao što su TIBC – kapacitet vezivanja gvožđa za transferin, UIBC – kličina ukupnog transferina koji nije zasićen gvožđem – i TS%-procenat vezujućih mesta za gvožđe na transferinu. Ovo su rutinski laboratorijski parametri u dijagnostici statusa gvožđa.

Hematopoeza i metabolizam hematopoeznih matičnih ćelija su u tesnoj vezi. Značaj energetskog metabolizma i uticaja mitohondrija opisan je u najnovijem preglednom radu Morganti-ja i saradnika iz 2022.godine (12). Matične ćelije za hematopoezu se nalaze u niši koštane srži, hipoksičnom mikrokruženju koje ih primorava da se za proizvodnju energije oslanja na anaerobnu glikolizu. Faktori koji proizvode hipoksiju (Hif-1) su veoma značajno prisutni i omogućuju da ćelije hematopoeze miruju u G0 fazi, čime se čuvaju i štede za aktivaciju onda kada su potrebne, dok sa druge strane svao izaganje kiseoniku povećava oksidativno oštećenje i potenciju matičnih ćelija za hematopoezu. Matične ćelije smanjeno uzimaju glukozu u odnosu na hematopoezne ćelije većeg nivoa diferencijacije i smatra se da je to značajan metabolički mehanizam kojim se postiže njihovo mirovanje. Njihovo metaboličko mirovanje štiti matične ćelije od preranog iscrpljivanja od diferencijacije, te omogućuje da se celoživotno organizam snadeva uobličnim elementima krvi. Hematopoezne ćelije u mirnoj fazi imaju mehanizme zaštite od oksidativnog stresa, što postižu povezanim sadržajem antioksidativnih enzima kao što je superoksid dismutaza ili faktor eritroida 2. Inhibicijom ovih faktora matične ćelije gube osobine koje imaju matične ćelije kao što su samoobnova i ispravna diferencijacija, pa se dešavaju defektne hematopoeze. Oksidativni status je u tesnoj vezi sa metabolizmom glukoze.

Prebacivanje glukoze u pentozofosfatni put umesto u ciklus trikarboksilnih kiselina je mehanizam koji smanjuje stvaranje oksidativnog stresa u matičnim ćelijama. Metabolizam proteina takođe može uticati na hematopoezne ćelije, a u prilog navedenom govori činjenica da je koncentracija aminokiselina u koštanoj srži gotovo 100 puta veća u odnosu na koncentraciju u cirkulaciji. Tako na primer glutamin podstiče ciklus trikarboksilnih kiselina i omogućuje da ćelija izađe iz mirovanja u fazu deljenja. Pored toga glutamin ima važnu ulogu u očuvanju integriteta hematopoezne linije jer stvaranje ćelija eeritroidne loze zahteva biosintezu nukleotida zavisnih od glutamina. Druga grupa aminokiselina su aminokiseline razgranatih lanaca, koji imaju veliku regulatornu ulogu tokom profilefacije matičnih ćelija, ali ne i u njihovom mirovanju. Na ogleđima kod laboratorijskih miševa je pokazano da proliferacija matičnih ćelija zavisi od jedne razgranate aminokiseline – valina. Hematopoeza može biti ograničena dostupnošću aspartata, purina i asparagina u procesu regeneracije hematopoeznog procesa. Aminotransferaza razgranatog lanca 1 je značajna u regulaciji leukomijskih ćelija (13-15). Veoma veliku ulogu igra i metabolizam lipida u funkcionisanju hematopoeznih matičnih ćelija. Oksidacija masnih kiselina predstavlja veoma značajan put za održavanje matičnih ćelija. Oksidacija masnih kiselina predstavlja glavni katabolički put kojim se proizvodi energija u matičnim hematopoeznim ćelijama. Dugolančane masne kiseline se aktiviraju u citosolu pa se transportnim sistemom transportuju u mitohondrije. U njima se dešava beta oksidacija kroz više poznatih etapa stvarajući acetil koenzim A koji pokreće ciklus trikarboksilnih kiselina. Brisanje gena za regulaciju oksidacije masnih kiselina dovodi matične ćelije hematopoeze do gubitka potencijala da se rekonstruišu i održe. Zbog značaja lipolize kod preživara i činjenice da se matične ćelije nalaze u nišama koštane srži koje su bogate lipidima, razmotrićemo i vezu između adipocita koštane srži i hematopoeze. Istraživanja su pokazala da je broj adipocita u koštanoj srži u negativnoj korelaciji sa brojem matičnih hematopoeznih ćelija, što je deo fiziološkog procesa starenja kostiju, jer se u nekim kostima veoma brzo koštana srž napuni adipocitima, dok se u nekim kostima hematopoeza odvija celog života pa je broj adipocita manji. Nađeno je da smanjenje adipogeneze može povećati potencijal matičnih ćelija, ali sa druge strane što je veći broj adipocita posle izlaganja zračenju veća je i

proliferacija matičnih ćelija. Pokazano je da su adipociti bogati faktorima koji su od značaja za oporavak matičnih ćelija nakon izlaganja zračenju. Takođe je utvrđeno da prilikom delovanja infekcije ili inflamacije neaktivne matične ćelije uzimaju veće količine masnih kiselina, te da im one pomažu u održavanju metaboličke plastičnosti i u prilagođavanju. Prema nekim pretpostavkama adipociti su neophodni kada je potrebno brzo pokrenuti hematopoezu, ali preveliki broj adipocita otežava proces hematopoeze od nivoa matične ćelije (16-19). Oksidacija masnih kiselina je mnogo niža kod ćelija u deobi, nego kod matične ćelije u mirovanju, glikoliza je visoka i kod ćelije u mirovanju i kod ćelije u deobi, dok se mnogo više ATP-a stvara kod ćelije u ciklusu u odnosu na hematopoeznu ćeliju u Go fazi.

FLEBOTOMIJA, KRVARENJA I NJIHOVI EFEKTI NA KRVNU SLIKU I METABOLIČKI PROFIL

Flebotomija predstavlja postupak uzimanja krvi u dijagnostičke ili terapijske svrhe tako što se vrši plasiranje ugle u neku anatomske dostupnu venu. Krv ima veliki potencijal samoobnavljanja, ali postoji potreba da se standardizuje način i zapremina uzete krvi, kako se čestim flebotomijama ne bi životinja uvela u hipovolemiju ili anemiju.

Krv se uzima u određenoj zapremini, a određeni su standardi za različite životinjske vrste. Radi se o onoj zapremini krvi koja se može uzeti, a koja neće izazvati određena bolesna stanja kod jedinke niti jatrogenu anemiju ili hipovolemiju. Zapremine su prikazane u tabeli i odnose se na zdrave, za vrstu uobičajene, norlamne i odrasle jedinke. Ukoliko se radi o bolesnim životinjama mlađim životinjama ili životinjama koje su podvrgnute nekom eksperimentu visoke invazivnosti ove zapremine moraju biti redukovane. Ukupna zapremina krvi u cirkulaciji je 5,5-8% telesne težine životinje. Uzimanje krvi koje ne podrazumeva dodatno praćenje i koje ne može da dovede do nekog terminalnog nepovoljnog ishoda je 10% ukupne zapremine krvi. Smatra se da prikupljanje krvi u ovoj zapremini može biti ponavljano na dve nedelje kod longotudinalnih, serijskih uzimanja, kao što se to često čini kod ovnova čija se krv koristi za biotehnoške procese (npr. kod proizvodnje mikrobioloških podloga ili kod proizvodnje krvi za istraživačke svrhe). Tako se kod ovnova može uzeti 6,6 ml/kg krvi na svake dve

nedelje. Ukoliko se koriste ovnovi rase Bosanska pramenka koji imaju oko 60 kg, to znači da se maksimalno može uzeti 396 mL krvi u jednom vađenju u dve nedelje. Uzimanje veće zapremine preko ove mora biti pod nadzorom i preporučuje se davanje određene zapremine tečnosti radi nadoknade. Odmor između dva vađenja krvi mora biti optimalan. Ukoliko se uzme oko 1% krvi sledeće vađenje se može ponoviti već narednog dana, kod uzimanja 5-7% krvi sledeće uzimanje se može vršiti za nedelju dana, ako se uzme oko 10% krvi onda period odmora do sledećeg vađenja minimum 2 nedelje, a ako se uzme 15% zapremine cirkulišuće krvi onda odmor mora trajati minimalno mesec dana, odnosno 4 nedelje (20-23). Uzorkovanje krvi se vrši iz različitih dostupnih krvnih sudova, a kod ovnova je najpovoljnija jugularna vena. Uzimanje krvi iz ove vene je relativno jednostavno i ono omogućuje dobijanje srednje do velike zapremine krvi. Uzorci dobijeni iz vene jugularis su dobrog do odličnog kvaliteta. Uzimanje krvi iz ove vene ne zahteva anesteziološki protokol, ali su potrebne mere asepse i antiseptike kako bi se dobila kvalitetna i održiva krv. Višekratno uzimanje krvi iz jugularne vene može biti izvor problema, pa je potrebno da se vena, odnosno strana menja, te da se izbegavaju višekratna uzorkovanja u kratkom vremenskom intervalu iz jugularne vene.

Prilikom kontinuiranog uzimanja krvi potrebno je vršiti monitoring životinje (24-26). Monitoring podrazumeva ispitivanje hematokrita i zapremine eritrocita, da bi se ustanovilo da li životinja ima potencijal da održava stalnost zapremine eritrocita i da svaki eritrocit ima adekvatnu zapreminu, odnosno da nema razvoja mikrocitoze zbog gubitka hemoglobina i gvožđa. Zdrave, odrasle životinje mogu u okviru 24 sata da povrate zapreminu tečnosti uzete krvi, ali je za vraćanje hematokrita na adekvatan nivo i dolazak novih eritrocita potrebno vreme, pa se mora optimizirati vreme između dva vađenja krvi. Akutni gubitak veće količine krvi neće odmah pokazati promene u crvenoj lozi ili hematokritu, jer se pokreće stresna reakcija i deluju vazokonstriktori kako bi se očuvao punjenost i turgor krvnih sudova. Zbog toga ove kontrole treba sprovesti tek po isteku 24-48 sati posle poslednjeg vađenja krvi. Smatra se da ukoliko je hematokrit ispod 35%, a koncentracija hemoglobina manja od 100g/L ne sme se pristupiti uzimanju krvi od takve životinje. Svakako potrebno je poznavati referentne i normalne vrednosti (koje su

uvek nešto šire od referentnih) za vrednosti hemoglobina i hematokrita kako bi se procenilo da li se krv može uzeti, u kojim vremenskim intervalima i kojoj pojedinačnoj i ukupnoj zapremini. Ukoliko je životinja mlada ili se radi o uzimanju veće količine krvi kada je životinja u riziku od dehidracije ili prerenalne azotemije onda se posle uzimanja zapremine krvi može dodati sterilni, izotonični fiziološki rastvor, a pored njega dobro je dati rastvor Ringer-laktat.

Koje su posledice flebotomije i gubitka krvi kod životinja? U jednom starijem ogledu ispitan je redosled karakterističnih promena progresivnog deficita gvožđa pokazan je serijskim krvarenjem normalnih dobrovoljaca i pacijenata sa policitemijom (27). Radi se o ogledu sprovedenog na ljudima. Posle puštanja krvi u perifernoj krvi su se javile promene po sledećem redosledu: a) pad koncentracije hemoglobina; b) smanjeno gvožđe u plazmi; c) retikulocitoza, povećanje MCV i MCH; d) smanjenje MCV i MCH, povećanje ukupnog proteina koji vezuje gvožđe; i e) smanjen MCHC. Karakteristične promene nedostatka gvožđa su se vratile na nivoe pre flebotomije u sledećem redosledu: a) koncentracija hemoglobina; b) ćelijski indeksi; c) serumsko gvožđe; g) protein koji vezuje gvožđe u serumu; i e) hemosiderin koštane srži, i na kraju se povećana gastrointestinalna apsorpcija gvožđa vratila u normalu. Ubrzana proizvodnja crvenih krvnih zrnaca nastavljena je kod pacijenata sa policitemijom uprkos indukciji umerenog nedostatka gvožđa. Kvalitet je žrtvovan za kvantitet, i na taj način je došlo do dublje mikrocitoze nego kod normalnih subjekata sa sličnim stepenom nedostatka gvožđa.

Gubitak krvi kod ovaca može imati različite uzroke i može dovesti do anemije. U jednom ogledu za indukciju akutne anemije, 40% zapremine krvi je uzeto kako bi se procenile kliničke, hematološke i biohemijske promene i oksidativni stres izazvan akutnim gubitkom krvi (28). Osamnaest zdravih ovaca je podvrgnuto flebotomiji da bi se uklonilo 40% zapremine krvi i procenjeno je klinički i laboratorijskim testovima za kliničke, biohemijske i varijable gasa u krvi i za procenu oksidativnog stresa pre indukcije (T0), 30 min (T30 min) i 6 (T6 h), 12 (T12 h) i 24 h (T24 h) nakon gubitka krvi. Ovce su pokazale tahikardiju od T30 min do T24 h, smanjenje hematokrita, broja eritrocita i koncentracije hemoglobina, sa nižim vrednostima na T24 h i povećanjem broja leukocita od T12 h nadalje. Došlo je do smanjenja pH krvi i pritiska

kiseonika na T30 min, povećana koncentracija laktata i smanjen bikarbonat u krvi u ovom trenutku. Nakon gubitka krvi, došlo je do povećanja srčane frekvencije počevši od vremena T30 min koji je ostao do T24 h. Brzina disanja i temperatura nisu pokazivali promene nakon početne vrednosti. Uzimanjem krvi na T0 došlo je do smanjenja vrednosti hematokrita i broja crvenih krvnih zrnaca i hemoglobina od T30 nadalje, pri čemu su niže vrednosti zabeležene na T24 h. Gubitak krvi je prouzrokovao povećanje broja leukocita od T12 h pa nadalje. Što se tiče biohemijskih varijabli, nakon uzimanja uzoraka krvi, došlo je do smanjenja ukupnog proteina i albumina od T30 min, i ove vrednosti su ostale konstantne do 24 h. U poređenju sa početnim vremenom, došlo je do povećanja koncentracije ureje od T6 h do T24 h. Porast uree je verovatno posledica prerenalne azotemije usled uzimanja velike zapremine krvi i opadanja zapremine krvi. Nije bilo varijacija u koncentraciji kreatinina i natrijuma nakon gubitka krvi. Nivoi laktata su povećani na T30, vraćajući se na početne vrednosti u kasnijim trenucima. Koncentracija kalijuma se smanjila na T6 h, nakon čega se vrednosti nisu razlikovale od početne vrednosti. Povlačenje krvi je dovelo do smanjenja pH vrednosti krvi i koncentracije bikarbonata na T30 min, sa povećanjem u narednim vremenima. Parcijalni pritisak ugljen-dioksida se povećao 24 h nakon gubitka krvi, dok se parcijalni pritisak kiseonika smanjio za 30 min i 6 h, vraćajući se na početne vrednosti u narednim trenucima. Zasićenost kiseonikom se smanjila na T30 min, sa povećanjem ove varijable u kasnijim vremenima. Posle gubitka krvi, aktivnost redukovano glutatona je pokazala niže vrednosti na T24 h, u poređenju sa početnom linijom. Nije bilo promena u koncentraciji malonaldehida, kao ni u SOD, GPK i aktivnosti katalaze nakon gubitka krvi. Došlo je do povećanja koncentracije ureje od T6 h do kraja studije, bez promene nivoa kreatinina. Životinje nisu pokazale promene u koncentraciji malonaldehida i aktivnosti enzima superoksid dismutaze, glutatona peroksidaze i katalaze, ali je došlo do smanjenja koncentracije redukovano glutatona na T24 h. Akutni gubitak od 40% zapremine krvi je sposoban da promoviše relevantne kliničke, hematološke, gasne i biohemijske promene u krvi, i doprineo je pojavi oksidativnog stresa sa smanjenom koncentracijom glutatona, što sugerise da ovaj proces stvara slobodne radikale u dovoljnoj količini da se smanji dejstvo antioksidanata. Došlo je do povećanja

koncentracije ureje od T6 h do kraja studije, bez promene nivoa kreatinina. Životinje nisu pokazale promene u koncentraciji malonaldehida i aktivnosti enzima superoksid dismutaze, glutatona peroksidaze i katalaze, ali je došlo do smanjenja koncentracije redukovano glutatona na T24 h. Akutni gubitak od 40% zapremine krvi je sposoban da promoviše relevantne kliničke, hematološke, gasne i biohemijske promene u krvi, i doprineo je pojavi oksidativnog stresa sa smanjenom koncentracijom glutatona, što sugerise da ovaj proces stvara slobodne radikale u dovoljnoj količini da se smanji dejstvo antioksidanata. Životinje nisu pokazale promene u koncentraciji malonaldehida i aktivnosti enzima superoksid dismutaze, glutatona peroksidaze i katalaze, ali je došlo do smanjenja koncentracije redukovano glutatona na T24 h. Akutni gubitak od 40% zapremine krvi je sposoban da promoviše relevantne kliničke, hematološke, gasne i biohemijske promene u krvi, i doprineo je pojavi oksidativnog stresa sa smanjenom koncentracijom glutatona, što sugerise da ovaj proces stvara slobodne radikale u dovoljnoj količini da se smanji dejstvo antioksidanata.

U drugoj studiji koja je vršena na kozama cilj je bio da se procene i uporede efekti krvarenja sa nešto nižim intenzitetom od 25% na fiziološke odgovore kod odraslih koza sa intaktnom slezinom i

splenektomijom (29). Krvarenje je dovelo do značajnog povećanja vrednosti rektalne temperature, brzine disanja i srčane frekvencije kod normalnih i splenektomiranih životinja. Vrednosti hematokrita, koncentracije hemoglobina i ukupnog broja leukocita bile su značajno niže kod normalnih i splenektomiranih životinja sa hemoragijom. Ovi parametri su se smanjili odmah nakon krvarenja kod splenektomiranih životinja, a nešto kasnije odnosno nakon 6 sati kod normalnih životinja. Kod životinja sa hemoragijama, vrednosti limfocita, eozinofila i monocita su bili niži, dok su vrednosti neutrofila bili viši. Koncentracije ukupnog proteina i albumina u serumu su se značajno smanjile kao odgovor na krvarenje kod normalnih i splenektomiranih životinja. Nivo glukoze u plazmi se značajno povećao kod životinja sa krvarenjem. Tokom oporavka, krvarene splenektomirane životinje zadržale su više vrednosti trijasa i niže vrednosti hematokrita i hemoglobina u poređenju sa hemoragičnim životinjama koje su bile netaknute slezine.

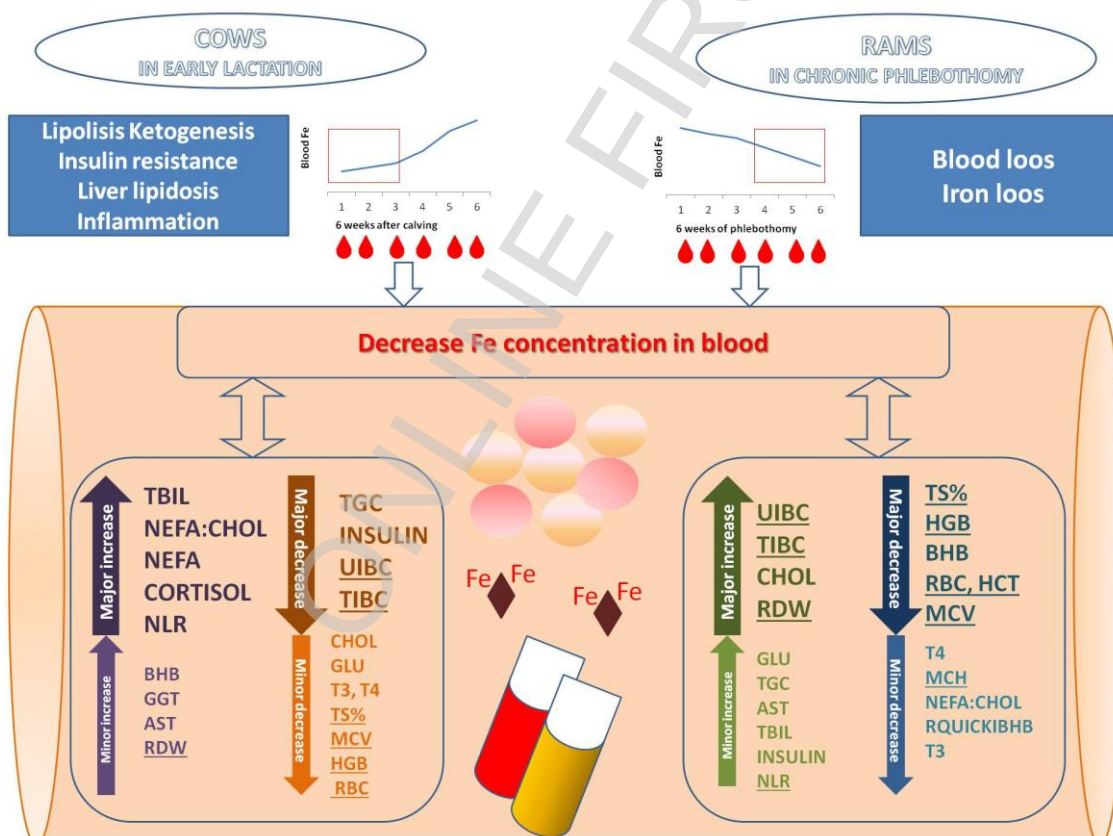
Procena gubitka krvi je od velikog značaja u istraživačkom i praktičnom smislu. Procena gubitka krvi je od velikog značaja posebno u perioperativnom periodu i tokom hirurških operacija. Perioperativni gubitak krvi je bitan parametar u istraživanju upravljanja krvlju kod pacijenata. Međutim, trenutno ne postoji metoda „zlatnog standarda“ za njenu kvantifikaciju. Direktna merenja gubitka krvi smatraju se nepouzdanim metodama, a formule za procenu su se pokazale značajno netačnim jer su povezane sa hemokoncentracijom hemodilucijom tokom samog zahvata kao i drugim faktorima koji mogu maskirati efekte gubitka krvi. Zbog toga je u jednom ogledu utvrđeno da je procena gubitka mase hemoglobina mnogo bolji pokazatelj statusa gubitka krvi nego obračunavanje ukupne zapremine krvi. Formula podrazumeva razliku u koncentraciji hemoglobina pre zahvata i najniže postignute koncentracije hemoglobina koja je pomnožena brojem sto i telesnom masom (30). Ovo govori u prilog činjenici da hemoglobin veoma brzo reaguje posle krvarenja čak i u kontrolisanim uslovima, kao što su krvarenja tko hirurškog zahvata, a ukazuje na značaj praćenja hemoglobina i drugih parametara crvene loze kod hronične flebotomije. Pored ovoga, kod ljudi je prikazano da flebotomija čak i onda kada se uzimaju male količine krvi u cilju laboratorijske dijagnostike, ali ako se to uzimanje ponavlja bilo kroz uzimanje krvi u različite vakutajnere ili kroz ponavljanje

analiza npr. u jedinicama intenzivne nege to može izazvati anemiju, pa čak postoji i posaban naziv anemija izazvana flebotomijom (eng., *Phlebotomy-induced anemia*, PIA) (31-33). Sve navedeno ukazuje da flebotomija može biti značajan uzrok hematoloških i metaboličkih promena.

U našim ogledima smo ispitivali pocezanost koncentracije Fe sa metaboličkim, endokrinim i metaboličkim parametrima kod ovnova u modelu flebotomije i kod krava u modelu peripartalnog odgovora (34,35). Koncentracija Fe je pokazala bolju linearnu korelaciju sa metaboličkim i hematološkim parametrima u poređenju sa vrednostima TIBC, IUBC, HGB i RBC. Promena parametara krvi u funkcijama Razlog bi mogao biti taj što transferin reaguje sporije u odnosu na Fe u organizmu, zbog svog poluživota i brojnih faktora koji mogu uticati na njegovo formiranje.²¹⁸ U analizi osetljivosti „šta-ako“ ispitali smo kako bi se promenila koncentracija svih parametara da je koncentracija Fe ispod referentne vrednosti na nivou od 9 $\mu\text{mol/L}$. Nedostatak Fe kod krava je povezan sa značajnim povećanjem lipolize i ketogeneze i opterećenja hepatocita (smanjenje holesterola i triglicerida, povećanje odnosa NEFA:CHOL, TBIL i GGT), i daljim smanjenjem vrednosti TIBC i IUBC, potvrđuje da promene u Vrednosti Fe kod krava u ranoj laktaciji deo su šireg homeoretskog odgovora. Zaključeno je da se lipidi akumuliraju u jetri odraslih osoba sa nedostatkom gvožđa (36). Interesantan nalaz je da je smanjenje vrednosti gvožđa povezano sa smanjenjem vrednosti insulina. Insulin je jedini antilipolitički hormon, tako da njegovo smanjenje može da izazove lipolizu, što izaziva upalu i metabolički stres. Pokazalo se da se proizvodnja insulina može očuvati samo ako je koncentracija Fe adekvatna, pa će deficit Fe ili preopterećenje Fe narušiti ekspresiju insulina (37). Kod krava ovakve promene vrednosti Fe ne bi dovele do dramatičnih promena parametara crvenih krvnih zrnaca. Utvrđeno je da postoji razlika između funkcionalnog nedostatka Fe i anemije usled nedostatka Fe, a kod krava je nedostatak Fe očigledno funkcionalno zasnovan (38). S druge strane, kod ovnova je uočeno smanjenje BHB sa povećanjem glikemije i vrednosti insulina. Kod miševa sa nedostatkom Fe detektovano je smanjenje β -oksidacije u jetri sa povećanjem lipogeneze (39). I krave i ovnovi imaju insulinsku rezistenciju, pri čemu krave imaju problem smanjene proizvodnje insulina i nedostatak antilipolitičkog efekta, dok ovnovi imaju veću otpornost perifernog tkiva na

insulin pa se i insulin i nivo glukoze povećavaju. Neka dosadašnja istraživanja su pokazala da se kod životinja sa nedostatkom gvožđa javlja mešana insulinska rezistencija, koja je u našem eksperimentu očigledno zavisila od fiziološkog statusa jedinke, odnosno da li je u pitanju jedinka u ranoj laktaciji ili mužjak (40). Kod ovnova je uočeno povećanje vrednosti holesterola i triglicerida usled povećane lipogeneze u jetri, dok su kod krava ove vrednosti smanjene usled njihove akumulacije u hepatocitima. Iako su krave i ovnovi u potpuno različitim metaboličkim stanjima, deficit Fe bi pokrenuo metaboličke procese u organizmu, koji prvenstveno utiču na metabolizam masti. Oko vremena začeća, nedostatak Fe ima tendenciju da poveća koncentraciju triglicerida u plazmi i

intrahepatički, a nedostatak gvožđa može ograničiti unos masnih kiselina (41, 42). Dok su metaboličke devijacije bile dominantnije tokom nedostatka gvožđa kod krava u ranoj laktaciji, utvrđeno je da nedostatak gvožđa kod ovnova dovodi do varijacija u vrednostima crvenih krvnih zrnaca, indeksa crvenih krvnih zrnaca, kapaciteta vezivanja gvožđa i TS%, što odgovaraju promenama usled anemije i/ili funkcionalnog nedostatka gvožđa (43). Ovi rezultati potvrđuju da je deficit gvožđa kod krava u laktaciji deo šire homeorhetskne adaptacije, dok je deficit izazvan hroničnom flebotomijom kod ovnova povezan sa direktnim gubitkom krvi i/ili Fe. Svi podaci i rezultati iz navedenih istraživanja sumarno su predstavljeni na Slici 1.



Slika 1. Grafički apstrakt ispitivanje hronične flebotomije ovnova i peripartalnog metabolizma kod krava na koncentraciju Fe i promena vrednosti ostalih parametara u funkciji Fe.

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was created as a result of research within the "Agreement on the transfer of funds for the financing of scientific research work of teaching staff at accredited Higher Education Institutions in 2024, contract registration number: 451-03-65/2024-03/ 200117".

LITERATURA

1. Oliveira D. C., Nogueira-Pedro A., Santos E. W., Hastreiter A., Silva G. B., Borelli P., Fock R. A. A review of select minerals influencing the haematopoietic process. *Nutrition Research Reviews* 2018, 31(2), 267-280.
2. Waldvogel-Abramowski S., Waeber G., Gassner C., Buser A., Frey B. M., Favrat B., Tissot J. D. Physiology of iron metabolism. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2014, 41(3), 213-221.
3. Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005, 9;122(5):789–801.
4. 50. Sharp P.A. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Für Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 2010, 80(4-5):231–42.
5. 51. Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001, 33(10):940–59.
6. 52. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004, 17, 306(5704), 2090–2093.
7. Cincović M., Belić B. Opšta patološka fiziologija. Udžbenik. Poljoprivredni fakultet Novi Sad – Departman za veterinarsku medicinu, 2021.
8. 54. Johns J., Heller M. Hematologic conditions of small ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2021, 37(1), 183-197.
9. 55. Ensley S. Evaluating mineral status in ruminant livestock. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2020, 36(3), 525-546.
10. 56. Radwinska J., Zarczynska K. Effects of mineral deficiency on the health of young ruminants. *Journal of Elementology* 2014, 19(3).
11. 57. Tvedten H. Classification and laboratory evaluation of anemia. *Schalm's veterinary hematology* 2022, 198-208.
12. Morganti C., Cabezas-Wallscheid N., Ito K.. Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *Hemasphere* 2022, 28, 6(7):e740. doi: 10.1097/HS9.0000000000000740.
13. Taya Y., Ota Y., Wilkinson A.C., et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*, 2016, 354:1152–1155.
14. Sommerkamp P., Altamura S., Renders S., et al. Differential alternative polyadenylation landscapes mediate hematopoietic stem cell activation and regulate glutamine metabolism. *Cell Stem Cell.* 2020, 26, 722–738.e7.
15. Oburoglu L., Tardito S., Fritz V., et al. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell.* 2014, 15, 169–184.
16. Ito K., Carracedo A., Weiss D., et al.. A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med.* 2012, 18, 1350–1358.
17. Pernes G., Flynn M.C., Lancaster G.I., et al.. Fat for fuel: lipid metabolism in haematopoiesis. *Clin Transl Immunology* 2019, 8:e1098.
18. Schönberger K., Obier N., Romero-Mulero M.C., et al.. Multilayer omics analysis reveals a non-classical retinoic acid signaling axis that regulates hematopoietic stem cell identity. *Cell Stem Cell.* 2022, 29, 131–148.e10.
19. Naveiras O., Nardi V., Wenzel P.L., et al.. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 2009, 460:259–263.
20. Hawk T.C., Leary S.T., Morris T.H. *Formulary for Laboratory Animals*, 3rd ed. Ames, IA Blackwell Publishing, 2005.
21. Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal* 2000, 29(10):47-53.
22. BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals*, 1993, 27(1):1-22
23. Forbes N, et. al. Morbidity and mortality rates associated with serial bleeding from the superficial temporal vein in mice. *Lab Animal* 2010, 39(8):236-40.
24. McGill M.W., Rowan A.N. Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques. *ILAR News* 1989, 31(4): 5-18.
25. Nahas K., Provost J.P., Baneux P.H., Rabemampianina Y. Effects of acute blood removal via the sublingual vein on haematological and clinical parameters in Sprague-Dawley rats. *Laboratory Animals* 2000, 34(4):362-71.
26. Guidelines for Blood Collection in Laboratory Animals: <https://www.research.uky.edu/division-laboratory-animal-resources/guidelines-blood-collection-laboratory-animals>
27. Conrad M.E., Crosby W.H. The natural history of iron deficiency induced by phlebotomy. *Blood* 1962, 20(2), 173-185.

28. Sousa R.S., Sousa C.S., Oliveira F.L.C., Firmino P.R., Sousa I.K.F., Paula V.V., Caruso N.M., Ortolani E.L., Minervino A.H.H., Barrêto-Júnior, R.A. Impact of Acute Blood Loss on Clinical, Hematological, Biochemical, and Oxidative Stress Variables in Sheep. *Vet. Sci.* 2022, 9, 229. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050229>.
29. Abdalla S. E., Abdelatif A. M. Physiological responses of goats (*Capra hircus*) to haemorrhage as influenced by splenectomy. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 2010, 5(2), 76-87.
30. Jaramillo S., Montane-Muntane M., Gambus P.L., Capitan D., Navarro-Ripoll R., Blasi A. Perioperative blood loss: estimation of blood volume loss or haemoglobin mass loss? *Blood Transfus.* 2020, 18(1), 20-29. doi: 10.2450/2019.0204-19
31. Bodley, T., Chan, M., Levi, O., Clarfield, L., Yip, D., et al. Patient harm associated with serial phlebotomy and blood waste in the intensive care unit: A retrospective cohort study. *PLoS One* 2021, 16(1), e0243782.
32. Chant C., Wilson G., Friedrich J.O. Anemia, transfusion, and phlebotomy practices in critically ill patients with prolonged ICU length of stay: a cohort study. *Crit Care.* 2006, 10(5), R140. pmid:17002795
33. Whitehead N.S., Williams L.O., Meleth S., Kennedy S.M., Ubaka-Blackmoore N., Geaghan S.M., et al. Interventions to prevent iatrogenic anemia: a Laboratory Medicine Best Practices systematic review. *Crit Care* 2019, 23(1), 278. pmid:31399052
34. Grubač, S., Cincović, M., Radinović, M., Potkonjak, A., Žekić, M., Starić, J., & Prodanov Radulović, J. (2024). Influence of Frequent Phlebotomy on Blood Iron Concentration, Haematological, Metabolic and Endocrine Parameters in Rams. *Acta Veterinaria*, 74(1).
35. Grubač Siniša, Cincović Marko, Djokovic Radojica, Majkić Mira, Došenović Marinković Maja, Petrović Miloš, Nikolić Sandra, Starić Jože, Prodanov Radulović Jasna. Blood iron status in dairy cows during early lactation – relationship with hematological, biochemical, endocrine and inflammatory response. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2023. 51: 1933.
36. Ahmed U., Latham P.S., Oates P.S. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012, 18, 4651-58.
37. Fillebeen C., Lam N.H., Chow S., Botta A., Sweeney G., Pantopoulos K. Regulatory connections between iron and glucose metabolism. *Int J Mol Sci* 2020, 21. doi: 10.3390/ijms21207773
38. Sattar A., Mirza R.H. Haematological parameters in exotic cows during gestation and lactation under subtropical conditions. *Pak Vet J* 2009, 29, 129-132.
39. Sherman A.R. Lipogenesis in iron-deficient adult rats. *Lipids* 1978, 13: 473–78.
40. Soliman A.T., De Sanctis V., Yassin M., Soliman N. Iron deficiency anemia and glucose metabolism. *Acta Biomed Atenei Parmensis* 2017, 88. doi: 10.23750/abm.v88i1.6049
41. Davis M., Rendina E., Peterson S., Lucas E., Smith B., Clarke S. Enhanced expression of lipogenic genes may contribute to hyperglycemia and alterations in plasma lipids in response to dietary iron deficiency. *Genes Nutr* 2012, 7, 415-425.
42. Georgieff M.K. Long-term brain and behavioral consequences of early iron deficiency. *Nutr Rev* 2011, 69: S43–S48.
43. Thomas D.W., Hinchliffe R.F., Briggs C., Macdougall I.C., Littlewood T., Cavill I. British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. *Br J Haematol* 2013, 161: 639-648.