



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Mirta Vučković

**UTJECAJ TRIJU MODELA INTRAOPERACIJSKE
ANALGEZIJE NA KONCENTRACIJU
KOPEPTINA, KORTIZOLA I HAPTOGLOBINA
PRI ARTROTOMIJI KOLJENOG ZGLOBA U
OVACA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mirta Vuckovic

**INFLUENCE OF THREE MODELS OF
INTRAOPERATIVE ANALGESIA ON THE
CONCENTRATION OF COPEPTIN, CORTISOL
AND HAPTOGLOBIN IN ARTHROTOMY OF THE
KNEE JOINT IN SHEEP**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Mirta Vučković

**UTJECAJ TRIJU MODELA INTRAOPERACIJSKE
ANALGEZIJE NA KONCENTRACIJU
KOPEPTINA, KORTIZOLA I HAPTOGLOBINA
PRI ARTROTOMIJI KOLJENOG ZGLOBA U
OVACA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Akademik Dražen Matićić
Prof. dr. sc. Višnja Nesek Adam

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mirta Vuckovic

**INFLUENCE OF THREE MODELS OF
INTRAOPERATIVE ANALGESIA ON THE
CONCENTRATION OF KOPEPTIN, CORTISOL
AND HAPTOGLOBIN IN ARTHROTOMY OF THE
KNEE JOINT IN SHEEP**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Drazen Maticic, DMV, MSc, PhD, Professor

Visnja Neseck Adam MD, PhD, Professor

Zagreb, 2025

O MENTORIMA

Akademik Dražen Matičić, redoviti profesor na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, rođen je 25. siječnja 1965. u Zagrebu. Od samih početaka rada na Veterinarskom fakultetu 1991. godine usmjerio je svoj rad na područja kirurgije, anesteziologije i eksperimentalnog rada u području biomedicine. Magisterij znanosti stekao je 1994. godine, doktorirao je 1999. godine, a oba kvalifikacijska rada su iz područja anesteziologije. Tijekom karijere napredovao je kroz akademska zvanja od asistenta do redovitog profesora u trajnom zvanju. U razdoblju od 2005. do 2012. godine obnašao je dužnost predstojnika Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju. U tom je mandatu modernizirao kliničku nastavu, razvio specijalističke studije, tečajeve trajne izobrazbe i uveo nove dijagnostičke i kirurške metode u kliničku praksu. Na Veterinarskom fakultetu bio je prodekan za kvalitetu i cjeloživotno obrazovanje u periodu od 2007. do 2010. godine te član Senata Sveučilišta u Zagrebu od 2009. do 2013. godine. U lipnju 2014. godine izabran je za člana suradnika Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti u Razredu za medicinske znanosti, a u lipnju 2018. promoviran je u redovitog člana HAZU. Time je postao jedan od rijetkih znanstvenika veterinarske struke koji su svojim znanstvenim radom, inovacijama i međunarodnim utjecajem zaslužili najviše nacionalno akademsko priznanje. Objavio je više od 100 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima, s preko 800 citata u SCOPUS bazi, 1360 Google Scholar bazi i h indeksom 15 odnosno 20. Rezultati njegovih istraživanja objavljeni su u časopisima visokog čimbenika utjecaja kao Gene Therapy, Bone, Smart Medicine, The American Journal of Sports Medicine, Scientific Reports, Growth factors, Materials, Cartilage i ostalima. Voditelj je Centra za eksperimentalnu kirurgiju na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, koji je pod njegovim vodstvom postao referentno mjesto za translacijska istraživanja u regenerativnoj medicini i biomaterijalima. Kroz taj Centar razvijeni su brojna istraživanja za ispitivanje biološke učinkovitosti terapijskih pristupa reparacije i regeneracije kosti i hrskavice. Akademik Matičić aktivno sudjeluje u brojnim međunarodnim istraživačkim projektima, od kojih se ističu BIO-COMET, BIO-CHIP, OSTEOproSPINE i LUMINATE financirani iz programa Europske unije, a voditelj je istraživanja i istraživač više kinesko-hrvatskih projekata razvoja i primjene biomaterijala. Njegov znanstveni i stručni rad ne samo da doprinosi razvoju veterinarske medicine, već ima i značajan utjecaj na translacijska istraživanja u humanoj medicini, posebice u području tkivnog inženjeringa i regenerativne ortopedije.

Prof. dr. sc. Višnja Neseck Adam, prim. dr. med. rođena je u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1985. godine, a diplomirala 1990. godine. Od 1993. godine zaposlena je u Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničke bolnice Sveti Duh, gdje je prošla cijeli profesionalni put u području anesteziologije i intenzivne medicine. Specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja završila je 1999. godine, a 2009. godine stekla je i užu specijalizaciju iz intenzivne medicine. Uz to, 2011. godine završila je i specijalizaciju iz hitne medicine. Od 2014. godine obnaša dužnost predstojnice Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KB Sveti Duh, a paralelno vodi i Objedinjeni hitni prijem te bolnice kao pročelnica, još od 2011. godine. U kliničkom radu aktivno se bavi mentorstvom, te djeluje kao glavna mentorica specijalizantima anesteziologije, intenzivne i hitne medicine, kao i članica ispitnih povjerenstava za specijalističke ispite. U znanstveno-nastavno zvanje redovnog profesora izabrana je 2020. god i u zvanje znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju 2018. godine. Od 2013. godine uključena je u dodiplomsku i poslijediplomsku nastavu, a njezin znanstveni interes usmjeren je na hitnu i intenzivnu medicinu, organizaciju zdravstvene skrbi i edukaciju u kritičnim stanjima. Od 2020. godine obnaša funkciju predsjednice Hrvatskog društva za hitnu medicinu Hrvatskoga liječničkog zbora (HLZ), unutar kojega aktivno sudjeluje u razvoju struke, izradi smjernica te poboljšanju kvalitete hitne medicinske službe u Republici Hrvatskoj. Tijekom svoje karijere objavila je oko 100 znanstvenih i stručnih radova, uključujući originalne znanstvene članke, prikaze slučajeva, pregledne radove te poglavlja u udžbenicima i priručnicima. Njezina istraživačka aktivnost obuhvaća teme iz organizacije i unapređenja hitne medicinske skrbi, liječenja kritično oboljelih bolesnika, optimizacije rada objedinjenog hitnog prijema te primjene suvremenih anestezioloških postupaka. Posebnu pozornost pridaje edukaciji medicinskog osoblja kroz simulacijske metode i interdisciplinarni pristup. Aktivno sudjeluje u mentoriranju specijalizanata i doktorskih studenata te je članica ispitnih povjerenstava i stručnih radnih skupina. Kao predsjednica Hrvatskog društva za hitnu medicinu HLZ-a, značajno doprinosi razvoju struke kroz izradu nacionalnih smjernica, organizaciju stručnih skupova i kontinuirano medicinsko usavršavanje.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Mirta Vučković, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2025.

ZAHVALA

Na samom početku, najdublju i najiskreniju zahvalnost upućujem suprugu Stjepanu i sinovima. Njihova ljubav, razumijevanje i beskrajna podrška bili su moj najveći oslonac i snaga. Zbog njih je svaki izazov bio lakši, a svaka sumnja brže nestajala. Oni su razlog i motivacija da ustrajem, čak i onda kada je put bio težak.

Posebno zahvaljujem svojim obiteljima Seletković i Vučković. Njihova prisutnost, ohrabrenje i bezuvjetna podrška dali su mi sigurnost i snagu u svim životnim i akademskim izazovima. Njihova vjera u mene bila je često jača od moje vlastite, a njihova pomoć uvijek je dolazila u pravom trenutku.

Od srca zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima dr. sc. Petru Kostešiću, dr. med. vet., dr. sc. Maji Pušić Novak i dr. sc. Andreji Vukasović Barišić, dr. med. koji su svojim znanjem, iskustvom i nesebičnom podrškom omogućili da ovaj projekt bude realiziran. Njihova profesionalnost, ali i ljudska toplina, činili su svaki korak ovoga puta lakšim.

Zahvaljujem kolegicama i prijateljicama dr. sc. Mariji Mamić, dr. med. vet. i dr. sc. Kim Korpes, dr. med. vet. ne samo na stručnoj pomoći, nego i na prijateljskoj podršci i razumijevanju. Njihove riječi ohrabrenja i spremnost da pomognu uvijek su bili svjetionik kada sam se osjećala umorno ili nesigurno.

Veliko hvala dugujem svom predstojniku, prof. dr. sc. Draženu Vnuku, dr. med. vet. na stalnoj podršci, povjerenju i snazi koju ulijeva svima nama. Njegova čvrstina i spremnost da ohrabri upravo u trenucima sumnje pokazali su mi koliko je važno imati istinskog vođu iza sebe.

Svojim kolegama i prijateljima s Katedre – prof. dr. sc. Niki Brkljači Bottegaro, dr. med. vet., dr. sc. Valentini Plichti, dr. med. vet., Niki Ivkiću, dr. med. vet., Katarini Miljak, dr. med. vet., i dr. sc. Petri Dmitrović, dr. med. vet. – zahvaljujem što su uvijek bili spremni pomoći, dati savjet ili jednostavno biti podrška. Zajedništvo koje se osjeća u našem timu neprocjenjiva je vrijednost.

Hvala i svim ostalim kolegama i suradnicima s Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju. Svaka vaša riječ, pomoć i suradnja utkali su se u ovaj rad i u moj profesionalni put.

Velika i iskrena zahvala ide kolegi dr. sc. Krunoslavu Bojaniću, dr. med. vet. čija je stručna pomoć u statističkoj obradi podataka bila neprocjenjiva. Njegovo strpljenje, jasnoća u objašnjenjima i nevjerojatna energija bili su dragocjeni.

Od srca zahvaljujem dr. sc. Blanki Beer Ljubić i prof. dr. sc. Zrinki Štritof, dr. med. vet., na nesebičnoj pomoći pri laboratorijskoj izradi rezultata. Njihovo znanje, strpljenje i spremnost da podijele svoje iskustvo značajno su doprinijeli kvaliteti i uspješnoj realizaciji ovoga istraživanja.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj komentorici, prof. dr. sc. Višnji Neseck Adam, dr. med. na svim savjetima, prijedlozima i stalnoj podršci. Njena stručnost, mudrost i ljudskost pomogli su mi da iz ovog rada izvučem najbolje i da ga oblikujem na način na koji sam mogla biti ponosna.

Na kraju, najiskreniju i najveću zahvalnost upućujem svom mentoru, akademiku Draženu Matičiću. Njegova uloga u mom akademskom i osobnom životu nadilazi granice mentorskog odnosa. Bio mi je podrška, učitelj, ali i drugi otac, s bezgraničnim strpljenjem i vjerom u moj uspjeh. Bez njegove prisutnosti, vodstva i nesebične pomoći, ovaj rad ne bi bio moguć.

SAŽETAK

UTJECAJ TRIJU MODELA INTRAOPERACIJSKE ANALGEZIJE NA KONCENTRACIJU KOPEPTINA, KORTIZOLA I HAPTOGLOBINA PRI ARTROTOMIJI KOLJENOG ZGLOBA U OVACA

Akutni stresni odgovor predstavlja složen niz neuroendokrinih, imunoloških i metaboličkih promjena kojima organizam nastoji održati homeostazu u uvjetima djelovanja različitih stresora. Aktivacija hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HPA) osi i reakcija akutne faze dovode do oslobađanja hormona stresa, sinteze proteina akutne faze te promjena u hemodinamskom statusu. Zbog svoje uloge u regulaciji endokrine, imunološke i metaboličke ravnoteže, akutni stresni odgovor predstavlja ključni mehanizam prilagodbe, ali i potencijalni čimbenik rizika za poremećaj fizioloških funkcija. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti intenzitet akutnog stresnog odgovora u ovaca ovisno o primijenjenom intraoperacijskom analgetskom protokolu. Analizirati međusobne odnose bioloških pokazatelja stresa i njihovu povezanost s hematološkim i hemodinamskim pokazateljima te identificirati protokol s najslabije izraženim stresnim odgovorom.

Sve životinje podvrgnute su istovrsnom operacijskom zahvatu u općoj anesteziji, pri čemu su prijeoperacijski protokol, anesteziološki postupci i indukcija analgezije bili standardizirani, dok su se intraoperacijski analgetski protokoli razlikovali ovisno o eksperimentalnoj skupini: intravenska primjena metadona, kontinuirana intravenska infuzija fentanila ili epiduralna primjena levobupivakaina. Životinje su raspoređene u tri skupine po deset jedinki, što je omogućilo usporednu procjenu učinkovitosti različitih metoda modulacije analgezije. U sklopu istraživanja provedena je longitudinalna analiza hematoloških, biokemijskih i stresom induciranih bioloških pokazatelja stresa u tri standardizirane vremenske točke: nakon premedikacije, tri sata nakon prvog vađenja krvi i 24 sata nakon prvog vađenja krvi. Za kvantifikaciju koncentracija kopeptina i kortizola korišten je komercijalno dostupan enzimski imunosorpcijski test (ELISA), dok je haptoglobin određen spektrofotometrijskom metodom. Tijekom trajanja opće anestezije i operacijskog zahvata, hemodinamski pokazatelji sustavno su praćeni u definiranim vremenskim intervalima, koji su predstavljali specifične točke za vrijeme trajanja anestezije. U istim vremenskim točkama mjeren je promjer zjenice i intraokularni tlak, što je omogućilo preciznu

procjenu neurofiziološkog i farmakološkog odgovora organizma na primijenjene anestetike i analgetike.

Operacijski zahvat uključivao je standardizirani model oštećenja hrskavice izveden na zglobnim površinama žlijeba bedrene kosti i ivera femoropatelnog zgloba. Ovaj pristup omogućio je kontrolirano oštećenje zglobne hrskavice, što je bilo ključno za usporedbu učinkovitosti različitih intraoperacijskih analgetskih protokola. Integriranjem laboratorijskih, kliničkih i neurofizioloških mjerenja dobivena je sveobuhvatna slika akutnog stresnog odgovora kod ovaca u ovom modelu

Vrijednosti kopeptina, kortizola i haptoglobina bile su pokazatelj aktivacije HPA osi i akutnog stresnog odgovora kod ovaca, pri čemu je kopeptin pokazao najveću konzistentnost. Kod fentanila su zabilježene najstabilnije i najniže razine biomarkera stresa, dok je levobupivakain inducirao kontroliran, ali heterogen odgovor, a metadon izazivao izraženiji i varijabilniji stres. Hematološki i imunološki pokazatelji pratili su sličan trend. Fentanil je uzrokovao najveći porast intraokularnog tlaka i promjera zjenice, levobupivakain umjeren, a metadon stabilan tlak uz izraženiji stres. Korelacije vrijednosti kopeptina s vrijednostima kortizola i haptoglobina bile su pozitivne. Rezultati upućuju da modulacija akutnog stresnog odgovora ovisi o specifičnom mehanizmu djelovanja analgetika, pri čemu fentanil pokazuje najveću učinkovitost, a levobupivakain kontroliran i heterogen odgovor.

Ključne riječi: Kopeptin, kortizol, haptoglobin, intraoperacijska analgezija, fentanil, levobupivakain, metadon, ovca

EXTENDED ABSTRACT

INFLUENCE OF THREE MODELS OF INTRAOPERATIVE ANALGESIA ON THE CONCENTRATION OF KOPEPTIN, CORTISOL AND HAPTOGLOBIN IN ARTHROTOMY OF THE KNEE JOINT IN SHEEP

The acute stress response represents a highly complex and integrative neuroendocrine, immunological, and metabolic process through which the organism strives to maintain homeostasis under exposure to diverse stressors, including nociceptive stimuli, surgical trauma, and psychological or physiological challenges. Central to this response is the activation of the HPA axis and the acute phase reaction, which collectively result in the secretion of stress mediators such as cortisol and arginine vasopressin, as well as the synthesis of acute-phase proteins including haptoglobin. These mechanisms initiate a cascade of adaptive physiological changes involving cardiovascular, respiratory, immune, and metabolic systems, with measurable consequences on hemodynamic stability, electrolyte balance, and immunomodulation.

Investigating the acute stress response is of particular relevance due to its dual biological role. On the one hand, it enables rapid adaptation and ensures survival under adverse conditions. On the other, excessive or prolonged activation may contribute to the breakdown of homeostasis, organ dysfunction, and the progression of stress-associated pathologies. In the perioperative and clinical context, a deeper understanding of the temporal and mechanistic dynamics of acute stress is critical for anticipating complications, evaluating physiological tolerance, and optimizing therapeutic strategies, particularly in the field of anesthesiology and surgical medicine.

The application of specific stress biomarkers—such as copeptin, cortisol, and haptoglobin—provides an invaluable opportunity for early detection, quantification, and monitoring of stress responses at multiple biological levels. Copeptin, as a stable and sensitive surrogate marker of arginine vasopressin release, offers a direct insight into neuroendocrine activation, while cortisol reflects HPA axis activity and haptoglobin represents systemic immunological and metabolic adaptation. Their combined assessment enables a reproducible and objective evaluation of stress intensity and duration, thus facilitating comparative analysis of different anesthetic and analgesic protocols, improving perioperative patient management, and reducing the risk of stress-related complications.

Beyond the perioperative setting, stress biomarkers have emerged as promising tools for early recognition, monitoring, and prognostication of various pathological conditions. Elevated or dysregulated biomarker profiles are increasingly associated with cardiovascular disease, sepsis, metabolic syndromes, and chronic inflammatory disorders. Consequently, their use transcends the boundaries of anesthesiology and surgery, positioning them as important diagnostic and prognostic indicators in both veterinary and human medicine.

The integration of biomarker assessment with clinical, hemodynamic, and neurophysiological parameters provides a comprehensive and multidimensional framework for studying the acute stress response. This translational approach not only enhances the individualization of analgesic and anesthetic protocols but also contributes to the development of novel diagnostic and prognostic strategies, thereby strengthening the link between experimental research, clinical application, and disease prevention.

To test the hypothesis that copeptin levels are positively correlated with cortisol and haptoglobin concentrations, and that different intraoperative analgesic protocols modulate the acute stress response in sheep, a controlled experimental study was conducted. The hypothesis was based on previous knowledge of the role of the HPA axis and acute-phase proteins in stress regulation, as well as the potential of copeptin as an early and reliable biomarker of stress. The aim was to simultaneously quantify biological stress indicators, compare the efficacy of three different analgesic protocols (methadone, fentanyl, levobupivacaine), and investigate their relationship with hematological and hemodynamic parameters.

The study included 30 healthy female crossbred sheep, randomly allocated into three experimental groups of ten animals each. Each group received a different intraoperative analgesic protocol: intravenous administration of methadone, continuous intravenous infusion of fentanyl and epidural administration of levobupivacaine. All animals underwent a standardized knee joint arthrotomy under general anesthesia. Preoperative protocols and anesthesia induction were identical for all animals, including intramuscular sedation with a combination of xylazine and ketamine, followed by intravenous induction with diazepam and thiopental. Inhalation anesthesia was maintained with a mixture of isoflurane and oxygen.

During anesthesia and surgery, hemodynamic parameters, pupil diameter, and intraocular pressure were systematically monitored at predefined time points: 15 minutes after premedication, after induction of anesthesia, before the skin incision, after the skin incision, 15 minutes after the

skin incision, and 30 minutes after the skin incision. These measurements enabled precise evaluation of neurophysiological and pharmacological responses to the administered anesthetics and analgesics. The surgical procedure involved a standardized full-thickness cartilage defect (6 mm in diameter) on the articular surfaces of the femoral trochlea and patella, providing a controlled model of cartilage trauma for evaluating the acute stress response and comparing the effectiveness of different intraoperative analgesic protocols.

Blood samples were collected at three time points (after sedation, 3 hours, and 24 hours after the first blood collection) to quantify stress biomarkers. Copeptin and cortisol were measured using commercially available ELISA kits. Haptoglobin were determined by spectrophotometric assay. Additionally, hematological (erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, platelets) and biochemical parameters (albumin, total proteins, ALT, AST, urea, creatinine, alkaline phosphatase, glucose, total bilirubin) were analyzed. Data analysis included longitudinal monitoring of biomarkers, correlation analysis between copeptin, cortisol, and haptoglobin, and comparison of the effectiveness of analgesic protocols in modulating the acute stress response.

The study demonstrated that the acute stress response in sheep undergoing knee arthrotomy is characterized by dynamic changes in neuroendocrine, immunological, and hematological parameters. Copeptin, cortisol, and haptoglobin were all elevated in response to surgical trauma, confirming their roles as reliable biomarkers of stress. Copeptin showed the highest consistency and correlation with cortisol levels, while haptoglobin demonstrated a somewhat weaker, yet positive association, fully supporting the primary hypothesis regarding biomarker correlations.

Among the three analgesic protocols, fentanyl was most effective in maintaining low and stable stress biomarker levels throughout the surgical procedure, reflecting a consistent attenuation of the acute stress response. Levobupivacaine provided a moderate and controlled response, with some individual variability in biomarker concentrations, suggesting that epidural analgesia can effectively modulate stress but may be influenced by individual physiological differences. Methadone induced a more variable and pronounced stress response, highlighting its comparatively lower capacity to blunt intraoperative stress.

Longitudinal analysis of hematological and biochemical parameters supported these findings. Fentanyl-treated sheep exhibited the most stable erythrocyte, leukocyte, lymphocyte, and platelet profiles, while levobupivacaine-treated animals showed moderate fluctuations, and methadone-treated animals demonstrated greater variability. Hemodynamic monitoring, including

intraocular pressure and pupil diameter, indicated that fentanyl significantly influenced sympathetic tone, whereas levobupivacaine maintained moderate and controlled responses.

These findings underscore the importance of selecting an appropriate intraoperative analgesic protocol to modulate the acute stress response effectively. While fentanyl demonstrated superior stability in biomarker profiles, levobupivacaine remains a valuable option for regional analgesia, offering controlled stress modulation with minimal systemic exposure. The results highlight that the acute stress response is influenced not only by the type of analgesic but also by its pharmacological mechanism and administration route.

Integration of biomarker analysis with hemodynamic and neurophysiological monitoring provides a comprehensive framework for understanding acute stress dynamics, enabling better-informed decisions for perioperative analgesic management and early detection of physiological perturbations. This study further supports the utility of copeptin as a sensitive and reliable biomarker for acute stress in ovine models, potentially translatable to clinical and veterinary applications.

Keywords: Acute stress response, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, copeptin, cortisol, haptoglobin, intraoperative analgesia, fentanyl, methadone, levobupivacaine, sheep

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACTH - adrenokortikotropni hormon (eng. *Adrenocorticotropic hormone*)
ALT - alanin-aminotransferaza
AP - alkalna fosfataza
APP – proteini akutne faze (eng. *Acute phase protein*)
ARDS - akutni respiratorni distres sindrom (eng. *Acute Respiratory Distress Syndrome*)
AST - aspartat-aminotransferaza
AVP arginin vazopresin
CRF - kortikotropin-oslobađajući čimbenik (eng. *Corticotropin releasing factor*)
CRP - C-reaktivni protein
DM EDTA - etilendiamintetraoctenom kiselinom
EM - Dulbeckov modificirani Eagleov medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
EtCO₂ - koncentracija ugljičnog dioksida u izdahnutom zraku
EKG – elektrokardiografija
ELISA - enzimski imunosorpcijski test
FBS - fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum*)
GR - glukokortikoidni receptor
GH – hormon rasta (eng. *Growth hormone*)
HPA - hipotalamo-hipofizno-adrenalna os
Hp - haptoglobin
HR - Srčana frekvencija (eng. *Heart rate*)
IOT - intraokularnog očnog tlaka
iSAT – invazivno mjeren sistolički arterijski tlak
iDAT - invazivno mjeren dijastolički arterijskog tlaka
IL-1 interleukin 1
IL-6 interleukin 6
kg – kilogram
LDL - lipoprotein niske gustoće (eng. low-density lipoprotein, LDL)
MCV - srednji volumen eritrocita
MCH - prosječna masa hemoglobina po crvenom krvnom zrcu
MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u jednoj litri eritrocita
mg – milligram
MPV - prosječni obujam trombocita
niSAT - neinvazivno izmjerene vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka
niDAT - neinvazivno izmjerene vrijednosti dijastoličkog arterijskog tlaka
N-CAM - Terapija stanicama nazalnih hondrocita (eng. *Nasal chondrocyte delivery from a Matrix*)
NK - stanice prirodne ubojice (eng. *Natural Killer*)
N-TEC - Terapija tkivnim inženjeringom na bazi nazalnih hondrocita (eng. *Nasal chondrocyte-Tissue Engineered Cartilage*)
pro-AVP - prekursora arginin-vazopresina
otk/min – otkucaja/minuti
PVN - paraventrikularna jezgra (eng. *Paraventricular nucleus*)
PZ – promjer zjenice

PVN – paraventrikularna jezgra hipotalamusa (eng. *Paraventricular Nucleus*)
RDW – raspodjela eritrocita po obujmu
RR – respiratorna frekvencija (eng. *respiratory rate*)
SAA - serumski amiloid A
SIADH - sindrom neprimjerene sekrecije antidiuretskog hormona (eng. *Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion*)
SNS - simpatički živčani sustav (eng. *Sympathetic Nervous System*)
SpO₂ - periferna zasićenost hemoglobina kisikom
TT - tjelesna temperatura
TNF- α - tumorski nekrotični čimbenik
alfa (eng. *Tumor Necrosis Factor alpha*)
v/v – volumen po volumenu

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1.	Sustavni odgovor organizma na nociceptivnu stimulaciju	3
2.2.	Odgovor simpatičkog živčanog sustava.....	4
2.3.	Hipotalamo-hipofizno-adrenalna os kao važna sastavnica neuroendokrinog odgovora na stresne podražaje	5
2.3.1.	Kortizol	7
2.4.	Reakcija akutne faze i sinteza proteina akutne faze.....	9
2.4.1.	Haptoglobin.....	12
2.5.	Kopeptin, novi biološki pokazatelj patofiziologije akutnog stresnog odgovora.....	14
2.6.	Utjecaj intraoperacijske analgezije na akutni stresni odgovor.....	16
2.6.1.	Opioidni analgetici.....	16
2.6.2.	Regionalna anestezija.....	17
3.	OBRAZLOŽENJE TEME	19
4.	MATERIJAL I METODE	21
4.1.	Bioinženjerski transplantati za obnovu hrskavice u bolesnika (engl. <i>Bioengineered grafts for cartilage healing in patients</i> , BIO-CHIP) projekt i primjena tkivnog inženjeringa na animalnom modelu.....	21
4.2.	Metodološki raspored istraživanja	22
4.3.	Eksperimentalne životinje.....	24
4.4.	Anestezija i analgezija za vrijeme artrotomije koljena ovce	24
4.5.	Nadzor ovaca tijekom anestezije	27
4.6.	Mjerenje intraokularnog tlaka i promjera zjenice	29
4.7.	Uzorkovanje krvi te pretrage krvi i krvnih seruma.....	31
4.7.1.	Hematološke i biokemijske analize krvi	32
4.7.2.	Određivanje bioloških pokazatelja stresa.....	32
4.8.	Operacijski zahvati.....	33
4.8.1.	Biopsija hrskavice nosnog septuma	33
4.8.2.	Ugradnja tkivnih presađaka	35
4.8.3.	Eutanazija i eksplantacija.....	39
4.9.	Statistička obrada podataka.....	41
5.	REZULTATI.....	43

5.1. Analiza bioloških pokazatelja akutnog stresnog odgovora u serumu ovaca.....	43
5.2. Analiza biokemijskih pokazatelja krvi.....	49
5.2.1. Analiza vrijednosti serumskog albumina u ovaca	49
5.2.2. Analiza serumske vrijednosti enzima alanin-aminotransferaze u ovaca	50
5.2.3. Analiza serumske vrijednosti enzima alkalne fosfataze	52
5.2.4. Analiza serumske vrijednosti enzima aspartat-aminotransferaze	53
5.2.5. Analiza serumskih vrijednosti bilirubina	54
5.2.6. Analiza serumskih vrijednosti glukoze	55
5.2.8. Analiza serumskih vrijednosti ukupnih proteina	57
5.3. Promjene hematoloških parametara tijekom perioperacijskog razdoblja	58
5.3.1. Hematološka analiza broja eritrocita.....	58
5.3.2. Promjene vrijednosti hematokrita tijekom perioperacijskog razdoblja	59
5.3.3. Analiza koncentracije leukocita u perioperativnom periodu	60
5.4. Analiza hemodinamskih pokazatelja tjeka anestezije.....	61
5.4.1. Analiza frekvencije disanja nakon primjene analgetika	61
5.4.2. Analiza frekvencije rada srca nakon primjene analgetika	63
5.4.4. Analiza neinvazivno i invazivno mjerenog dijastoličkog arterijskog krvnog tlaka....	66
5.4.5. Analiza vrijednosti intraokularnog tlaka tijekom perioperacijskog razdoblja	67
6. RASPRAVA	70
6.1. Biološki pokazatelji stresa tijekom perioperacijskog razdoblja.....	70
6.2. Biokemijski pokazatelji akutnog stresnog odgovora u perioperacijskom razdoblju	72
6.2.1. Hepatocelularna funkcija uslijed stresa tijekom operacijskih zahvata	72
6.2.2. Metabolički odgovor na akutni stres.....	75
6.3. Hematološke promjene krvnih parametara tijekom kirurškog stresa	76
6.4. Hemodinamska stabilnost uslijed primijenjenog protokola intraoperacijske analgezije...	78
6.4.1. Respiracijska frekvencija i srčani ritam.....	78
6.4.2. Promjene sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka mjerene invazivnom i neinvazivnom metodom.....	79
6.5. Promjene intraokularnog tlaka i promjera zjenice oka uslijed primjene različite intraoperacijske analgezije.....	81
7. ZAKLJUČCI.....	83
8. POPIS LITERATURE	84
9. PRILOG A	101
10. ŽIVOTOPIS AUTORICE S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA	107

1. UVOD

Perioperacijski stresni odgovor predstavlja kompleksnu interakciju neuroendokrinih i imunoloških mehanizama kojima organizam nastoji očuvati homeostazu tijekom i nakon operacijskog zahvata. Aktivacija HPA osi i simpatičko–adrenomedularnog sustava dovodi do oslobađanja hormona i medijatora stresa, među kojima kortizol ima središnju ulogu u regulaciji metaboličkih i imunoloških procesa. Uz kortizol, u posljednjem desetljeću u kliničkoj i eksperimentalnoj medicini raste interes za kopeptin, stabilni peptidni fragment prekursora arginin-vazopresina, koji se pokazao pouzdanim biološkim pokazateljem akutnog stresa. Njegove koncentracije u plazmi odražavaju aktivnost HPA osi te omogućuju preciznije praćenje dinamičkog odgovora organizma u stresnim stanjima (MORGENTHALER i sur., 2006.; KATAN i sur., 2009.).

Uz endokrine pokazatelje, važnu ulogu u procjeni perioperacijskog odgovora imaju i proteini akutne faze, poput haptoglobina. Haptoglobin je visoko osjetljiv marker upale i tkivnog oštećenja, čiji porast u plazmi ukazuje na aktivaciju sistemskog upalnog odgovora. Praćenje haptoglobina u kombinaciji s kortizolom i kopeptinom omogućuje sveobuhvatniji uvid u složene mehanizme perioperacijskog stresa.

Izbor analgetika i anestetika može značajno modulirati intenzitet stresnog odgovora. Opioidi, poput fentanila i metadona, poznati su po svojoj učinkovitosti u ublažavanju boli, no istodobno mogu različito djelovati na regulaciju HPA osi. Studije upućuju na to da opioidi mogu inhibirati lučenje CRH u hipotalamusu, mijenjati funkciju hipofize te modulirati lučenje kortizola (HAROUTOUNIAN, 2018.). Fentanil se u literaturi navodi kao opioid s potencijalno stabilnijim učinkom na endokrini odgovor, dok metadon može uzrokovati veće varijacije u razinama bioloških pokazatelja stresa (YANG i sur., 2016.; PSARIANOS i sur., 2025.; ZOJAJI i sur., 2023.).

S druge strane, lokalni anestetici, poput levobupivakaina, primijenjeni epiduralno mogu smanjiti perioperacijski stresni odgovor modulacijom HPA osi i inhibicijom sistemske upalne reaktivnosti (PERSEC i sur., 2009.; LYKKEGAARD i sur., 2005.; RANGAPRIYA i sur., 2023.). Studije pokazuju da epiduralna analgezija može dovesti do nižih vrijednosti kortizola u usporedbi s općom anestezijom i intravenskim opioidima (AHISKALIOGLU i sur., 2016.; BAYAZIT i sur.,

2013.). Unatoč sve većem broju istraživanja, podaci koji specifično ispituju povezanost između različitih analgetika i dinamičkog odgovora kopeptina u perioperacijskim okolnostima još uvijek su ograničeni (VON RECUM i sur., 2015.). Posebno nedostaju komparativne studije koje istodobno analiziraju više bioloških pokazatelja stresa u odnosu na primjenu različitih analgetičkih protokola.

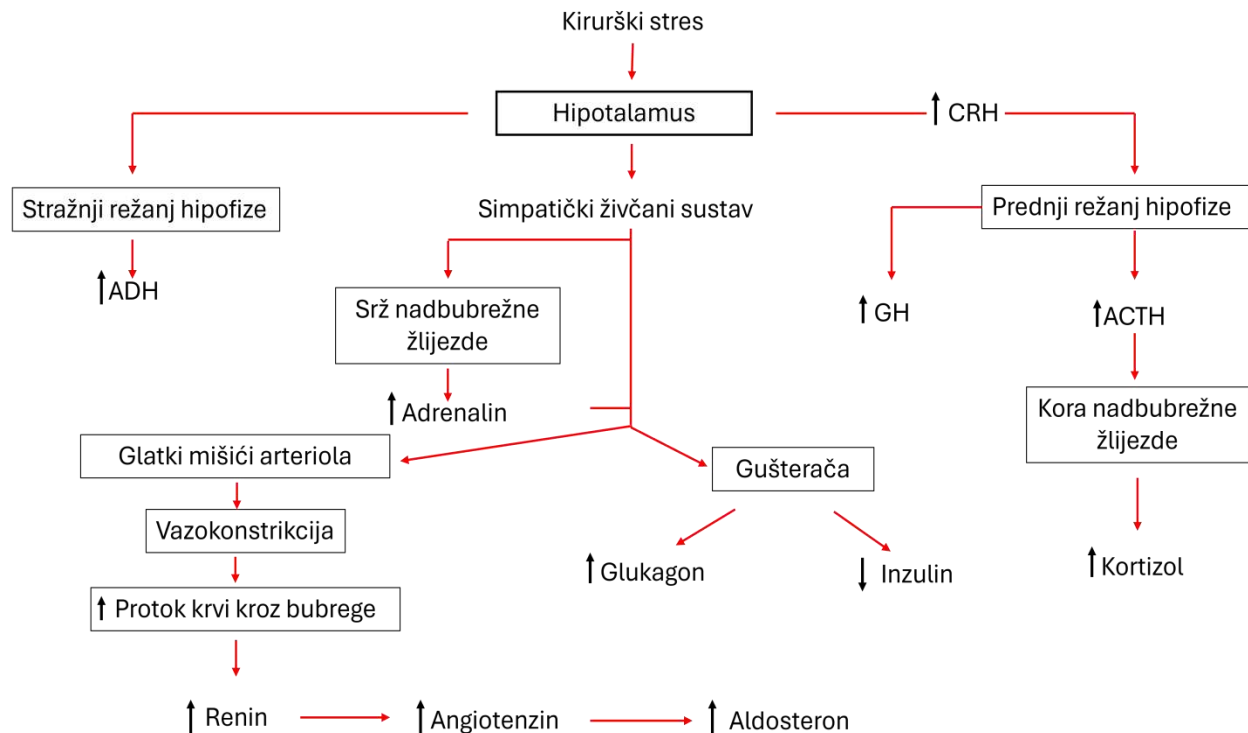
U ovom istraživanju željeli smo usporediti učinak fentanila, levobupivakaina i metadona na razine kopeptina, kortizola i haptoglobina u eksperimentalnom modelu artrotomije kod ovaca, kako bi se procijenila njihova uloga u modulaciji perioperacijskog stresnog odgovora. Posebna pažnja usmjerena je na validaciju kopeptina kao potencijalno najstabilnijeg i najpouzdanijeg biološkog pokazatelja u ovom kontekstu te na ispitivanje korelacija između navedenih bioloških pokazatelja stresa.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Sustavni odgovor organizma na nociceptivnu stimulaciju

Sustavni odgovor organizma na nociceptivni podražaj je složen niz međusobno povezanih reakcija koje se odvijaju na lokalnoj i sistenskoj razini organizma. Na mjestu podražaja, aktivacijom nociceptora koji su smješteni u koži, mišićima, zglobovima i unutarnjim organima, započinje prijenos bolnog impulsa putem perifernih živčanih vlakana prema središnjem živčanom sustavu (HANNIBAL i BISHOP, 2014.). Rezultat je refleksni motorni odgovor te svjesna percepcija boli u moždanoj kori. Bol se u fiziološkom smislu smatra stresnim podražajem, a stres se definira kao svaki poremećaj homeostaze koji mobilizira obrambene mehanizme organizma s ciljem očuvanja unutarnje ravnoteže (LUMLEY i sur., 2011.). Poremećaji homeostatske ravnoteže aktiviraju HPA os, simpatički živčani sustav (SNS) i imunološki sustav (Slika 1.) koji pokreću niz kompenzacijskih neuroendokrinih prilagodbi kao odgovor na djelovanje stresora (MILLER i O'CALLAGHAN, 2002.). Aktivacijom simpatičkog živčanog sustava dolazi do tahikardije, hipertenzije, redistribucije krvotoka prema vitalnim organima i smanjenja gastrointestinalne aktivnosti. Uslijed reakcije na podražaj dolazi do oslobađanja stresnih hormona, prvenstveno adrenalina, noradrenalina i kortizola koji svojom sintezom moduliraju metaboličke procese, imunološki odgovor i percepciju boli.

Uslijed stresnog odgovora dolazi i do reakcije akutne faze koju PETERSEN i sur. (2004.) opisuju kao ranu, složenu, antigen nespecifičnu sustavnu reakciju koja se javlja prije specifičnog imunološkog odgovora.



Slika 1. Odgovor organizma na stres putem hipotalamusa, simpatoadrenalnog i simpatorenalnog odgovora. Modificirana slika prema CUSACK i BUGGY, 2020.

2.2. Odgovor simpatičkog živčanog sustava

U neuroendokrinnoj regulaciji odgovora na stres ključnu ulogu predstavlja paraventricularna jezgra (PVN) hipotalamusa. S obzirom da PVN djeluje kao osjetilni i koordinacijski centar, prima informacije o unutarnjim i vanjskim promjenama u organizmu, uključujući promjene krvnog tlaka (hipotenziju), razine upalnih medijatora i metabolički stres. Posebno je osjetljiva na aferentne signale koji dolaze iz oštećenih tkiva, osobito nakon kirurške traume, a ti se impulsi prenose putem limbičkog sustava, s naglašenom ulogom amigdale i jezgrama moždanog debla. Simpatički živčani sustav se aktivira kao dio brze, „bori se ili bježi“ (eng. *fight or flight*) reakcije. Aktivacijom nadbubrežne srži putem simpatičkih preganglijskih neurona dolazi do izravnog otpuštanja adrenalina u krvotok (ULRICH-LAI i HERMAN, 2009.).

Adrenalin djeluje na adrenergičke receptore (alfa i beta), što rezultira nizom fizioloških odgovora. Aktivacijom β_1 -adrenergičkih receptora u srcu dolazi do povećanja srčane frekvencije

(pozitivni kronotropni učinak) i jačanja kontraktilnosti miokarda (pozitivni inotropni učinak). Istovremeno, stimulacija $\alpha 1$ -receptora uzrokuje vazokonstrikciju perifernih krvnih žila, što dovodi do porasta sistemskog vaskularnog otpora i arterijskog tlaka. Na dišnom sustavu, adrenalin djeluje putem $\beta 2$ -adrenergičkih receptora, uzrokujući bronhodilataciju što omogućuje povećani protok zraka kroz dišne puteve i bolju oksigenaciju. Nadalje, adrenalin izaziva midrijazu aktivacijom alfa-adrenergičkih receptora u glatkim mišićima šarenice (HERMAN i sur., 2012.). Također dolazi do redistribucije krvotoka pri čemu se povećava perfuzija skeletnih mišića, dok se smanjuje protok prema organima koji nisu vitalni za neposrednu motoričku aktivnost, poput bubrega i probavnog sustava. Ova prilagodba omogućava bržu i učinkovitiju fizičku reakciju organizma na prijetnju. Metaboličke promjene uključuju pojačanu lipolizu i glikogenolizu u jetri i mišićima, što dovodi do povećanja razine glukoze u krvi (hiperglikemije), kako bi se osigurao brz izvor energije. Istovremeno raste i stanični metabolizam te zgrušavanje krvi što se smatra zaštitnim mehanizmom u slučaju ozljede i gubitka krvi (WATT i sur., 2015.).

2.3. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna os kao važna sastavnica neuroendokrinog odgovora na stresne podražaje

HPA os predstavlja složeni integrirani neuroendokrini sustav koji uključuje međusobne interakcije hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde, a temeljen je na precizno uravnoteženim pozitivnim i negativnim povratnim mehanizmima. Ključna uloga HPA očituje se u regulaciji brojnih fizioloških funkcija, uključujući odgovor na stres, imunološku aktivnost te metabolizam (BURFORD i sur., 2017.). U normalnoj fiziologiji, tri strukture reguliraju odgovor na stres reakciju: PVN hipotalamusa, prednji režanj hipofize i korteks nadbubrežne žlijezde. Središnji mehanizam u kontroli lučenja hormona nadbubrežne žlijezde, koji sudjeluju u održavanju i ponovnom uspostavljanju homeostaze, predstavlja HPA os (SMITH i VALE, 2006.). Funkcionalna homeostaza HPA osi ovisi o dinamičkoj ravnoteži izlučivanja i djelovanja nekoliko regulatornih hormona. Hipofiziotropni neuroni koji su smješteni u medijalnoj parvocelularnoj podjedinici PVN sintetiziraju i izlučuju kortikotropin-oslobađajući čimbenik (engl. *Corticotropin Releasing Factor*, CRF), koji je glavni regulator HPA osi. Po svom sastavu je peptid te se sastoji od 41 aminokiseline. Izoliran je 1981. godine iz hipotalamičnog tkiva ovce te je utvrđeno da CRF predstavlja primarni regulator lučenja adrenokortikotropnog hormona (eng. *Adrenocorticotropic*

hormone, ACTH) iz kortikotropa prednjeg režnja hipofize (RIVIER i VALE, 1983.; CLARK i KING, 2003.). Nakon što se CRF otpusti u hipofizne portalne žile prenosi se dalje do prednjeg režnja hipofize. Vezanjem CRF-a za njegove receptore na kortikotropnim stanicama hipofize, potiče se izlučivanje ACTH u sistemsku cirkulaciju. Nakon što se ACTH veže na specifične receptore u kori nadbubrežne žlijezde, stimulira zonu fascikulatu na sintezu i otpuštanje glukokortikoida (HILLHOUSE i GRAMMATOPOULOS, 2006.).

Glukokortikoidi čine skupinu steroidnih hormona uključenih u regulaciju brojnih fizioloških procesa, uključujući metabolizam, funkciju kardiovaskularnog sustava, imunološki odgovor te ponašanje. Najznačajniji među njima je kortizol kod ljudi i kortikosteron kod glodavaca. Njihovo djelovanje posreduje citosolni protein mase 94 kDa, poznat kao glukokortikoidni receptor (GR), koji omogućuje specifičnu i ciljanu staničnu signalizaciju (SAPOLSKY i sur., 2000.; CHARMANDARI i sur., 2005.). Ovi hormoni djeluju sustavno, utječući na velik broj tkiva i organa, te istovremeno aktiviraju negativnu povratnu spregu putem glukokortikoidnih receptora u središnjem živčanom sustavu, čime inhibiraju daljnje izlučivanje CRH-a i ACTH-a, te se ujedno regulira ukupna aktivnost HPA osi. Narav i intenzitet odgovora HPA osi iznimno su važni za očuvanje fiziološke ravnoteže tijekom izloženosti stresnim podražajima. Osim HPA osi važnu ulogu u regulaciji adaptacijskog odgovora na stres imaju i noradrenergični neuroni moždanog debla, simpatičko-adrenomedularni sustav te parasimpatički živčani sustav (CARRASCO i VAN DE KAR, 2003.).

2.3.1. Kortizol

Kortizol, najpoznatiji hormon stresa, ima značajnu ulogu u različitim funkcijama u tijelu, a sinteza mu je izravno povezana i regulirana preko HPA osi. Djelovanjem ACTH aktivira se više intracelularnih signalnih puteva koji zajednički djeluju na pokretanje sinteze kortizola iz kolesterola. Jedan od njegovih učinaka je poticanje ekspresije receptora za lipoproteine niske gustoće (eng. low-density lipoprotein, LDL) na membrani stanica kore nadbubrežne žlijezde, čime se povećava unos kolesterola iz cirkulacije kao osnovnog prekursora u steroidogenezi. Uz pomoć enzima kolesterol-desmolaze (poznati kao CYP11A1) kolesterol se pretvara u pregnenolon koji je prvi korak u biosintezi kortizola (RAMAMOORTHY i CIDLOWSK, 2016.). Topljiv je u mastima te prolazi citoplazmatsku membranu u citosolu i veže se na GR. Prema Nicolaidesu i suradnicima (2010.) s obzirom na to da se receptori za kortizol nalaze u citoplazmi stanica osjetljivih na steroide, samo slobodni (nevezani) oblik kortizola može difuzijom kroz membranu ući u stanicu i vezati se za intracelularne GR. Kompleks kortizol–receptor zatim ulazi u staničnu jezgru i djeluje na ekspresiju gena (BUCKBINDER i ROBIENSON, 2002.). Kortizol se ne pohranjuje u stanicama kore nadbubrežne žlijezde, već se odmah nakon sinteze izlučuje u sistemsku cirkulaciju (ARLT i STEWART, 2005.). S obzirom da su GR prisutni u gotovo svim tjelesnim tkivima, kortizol ima potencijal utjecati na većinu organskih sustava (KADMIEL i CIDLOWSKI, 2013.). Stoga se njegova uloga očituje kroz sudjelovanje u stresnom odgovoru, regulaciji metaboličkih procesa, modulaciji upalnog odgovora te u regulaciji funkcije imunološkog sustava (OAKLEY i CIDLOWSKI, 2013.). Među najvažnijima učincima na imunološki sustav ističe se inhibicija upalnih T-limfocita, supresija proizvodnje protutijela od strane B-limfocita te smanjenje migracije neutrofila u upalnom procesu (AYROLDI i sur., 2012.).

Organizam je neprestano izložen različitim stresorima, a informacije o stresu obrađuju se ovisno o procijenjenom stupnju prijetnje, nakon čega tijelo pokreće odgovarajući adaptacijski odgovor. U stresnim situacijama aktivira se SNS, odgovoran za tzv. odgovor „bori se ili bježi“, tijekom kojeg dolazi do niza hormonalnih i fizioloških reakcija u organizmu (GALON i sur., 2002.). Amigdala, ključna struktura u obradi straha, emocionalnih reakcija i stanja pobuđenosti, procjenjuje prijetnju iz okoline i pokreće odgovarajuće neurološke odgovore (HAKAMATA i sur. 2017.; SAGHIR i sur. 2018.). U slučajevima kada je stresna situacija procijenjena kao značajna,

amigdala prenosi signal hipotalamusu. Kao odgovor, hipotalamus aktivira SNS, potičući nadbubrežne žlijezde na izlučivanje kateholamina, osobito adrenalina (epinefrina), što rezultira povećanom frekvencijom disanja i rada srca. Ukoliko organizam i dalje doživljava prijetnju, dolazi do uključivanja HPA osi. Aktivacijom ove osi, nadbubrežna kora počinje lučiti kortizol, ključni hormon stresa, koji održava tijelo u stanju pripravnosti. Tijekom akutnog stresa, katabolički učinci kortizola omogućuju mobilizaciju energetske rezervi, čime se osigurava dodatna energija potrebna za učinkovito suočavanje s izazovima (LEE i sur., 2015.).

Kortizol povećava raspoloživost glukoze za mozak djelujući na jetru, skeletno mišićno tkivo, masno tkivo i gušteraču. U jetri stimulira glukoneogenezu, dok istovremeno inhibira sintezu glikogena (KUO i sur., 2015.). U mišićnom tkivu dolazi do smanjene stanične potrošnje glukoze i povećane razgradnje proteina, čime se osiguravaju glukogene aminokiseline za potrebe glukoneogeneze (EXTON, 1979.). U masnom tkivu kortizol potencira lipolizu, dok u gušterači inhibira lučenje inzulina i stimulira sekreciju glukagona. Glukagon potom dodatno potiče hepatičku glikogenolizu, glukoneogenezu, ketogenezu i lipolizu. Kortizol pojačava učinke glukagona, epinefrina i drugih kateholamina u regulaciji energetskih procesa (BUSILLO i CIDLOWSKI, 2013.). Odgovor na stres koji posreduje kortizol osigurava da dovoljno hranjivih tvari doprije do mozga i drugih dijelova tijela koji mogu biti ugroženi stresnim događajem ili ozljedom. Povećana proizvodnja kortizola kao odgovor na stres predstavlja fiziološku prilagodbu koja doprinosi preživljavanju (LECLERE, 2017.). Nadalje, sam kortizol djeluje putem mehanizma negativne povratne sprege na HPA os kako bi regulirao vlastitu aktivnost (LEWIS i sur., 2005.).

2.4. Reakcija akutne faze i sinteza proteina akutne faze

Reakcija akutne faze javlja se vrlo brzo nakon izlaganja organizma vanjskim ili unutarnjim čimbenicima kao što su infekcija, upala, kirurška trauma, neoplastični rast, imunološki poremećaji ili stres, a očituje se kao složen skup sistemskih reakcija (GORDON i KOY, 1985.; GRUYS i sur., 1999.). Ključna komponenta reakcije akutne faze je sinteza proteina akutne faze (APP) čija ekspresija ovisi o razinama citokina, dok je aktivnosti citokina regulirana glukokortikoidima i čimbenicima rasta (GABAY i KUSHNER, 1999.; GRUYS i sur., 2005.). Citokini su proteinski hormoni koji induciraju akutnu faznu reakciju te djeluju kao glasnici između lokalnog mjesta ozljede i hepatocita koji sintetiziraju proteine akutne faze. Upalni citokini, interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) i tumorski nekrotizirajući čimbenik alfa (eng. Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α), primarno se izlučuju iz monocita, a njihovu aktivaciju potiču bakterijski toksini ili lokalno oštećenje tkiva (EL-DEEB i THARWAT, 2015.). Ceciliani i sur. (2012.) opisuju da se APP mogu sintetizirati i izvan jetre u nekim tkivima, poput testisa, masnog tkiva, pluća, jajnika, maternice, mliječnih žlijezda i probavnog trakta. Plazma koncentracije APP u zdravih životinja vrlo su niske. Tijekom akutne faze upale, njihove se razine značajno povećavaju već u prvim satima nakon izlaganja patogenim čimbenicima (CECILIANI i sur., 2002.; PETERSEN i sur., 2004.). S obzirom na njihovu koncentraciju klasificiraju se u dvije skupine. Pozitivni APP bilježe znatan porast koncentracije u serumu te se izdvaja haptoglobin (Hp), serumski amiloid A (SAA), C-reaktivni protein (CRP), alfa 1 antitripsin, hemopeksin, ceruloplazmin, fibrinogen i alfa-1-kiseli glikoprotein, dok su negativni APP oni čija se koncentracija smanjuje, a najpoznatiji među njima su albumin i transferin (DE LA CONCHA-BERMEJILLO i sur., 2000.; GONZÁLEZ i sur., 2008.). SAA i CRP inducirani su citokinom IL-1, smatraju se brzoreagirajućim proteinima akutne faze jer njihova koncentracija raste unutar četiri sata od upalnog podražaja te se značajno brzo vraća na početne vrijednosti (GANHEIM i sur., 2003.). Proteini akutne faze duge linije, najčešće se radi o haptoglobinu, inducirani su primarno citokinima IL-6, a karakterizira ih kasniji porast koncentracije u serumu koji može ostati povišen i do dva tjedna (LANNERGARD i sur., 2003.; GRUYS et al., 2005.).

Funkcija većine APP ukazuje na njihovu ključnu ulogu u imunološkom odgovoru domaćina. Najvažnije funkcije prikazane su u tablici 1. Smatra se da pozitivni APP sudjeluju u opsonizaciji i uklanjanju mikroorganizama i njihovih produkata, aktivaciji komplementnog

sustava, te vezivanju staničnih ostataka, osobito nuklearnih komponenti nastalih staničnom nekrozom (TOUSSAINT, 2000.; SCHROEDL i sur., 2001.). Osim toga, APP sudjeluju u neutralizaciji proteolitičkih enzima, vezivanju i uklanjanju slobodnog hemoglobina i reaktivnih spojeva kisika, čime sprječavaju oksidacijska oštećenja. Važna im je i imunomodulatorna funkcija, kojom reguliraju intenzitet i trajanje upalnog odgovora, doprinoseći održavanju homeostaze i ograničavanju oštećenja tkiva.

Tablica 1. Biološke aktivnosti proteina akutne faze kod ovaca

Modificirana tablica prema PETERSEN i sur., 2004.

Protein akutne faze	Kategorija	Aktivnost
Haptoglobin	Pozitivan	Vežanje hemoglobina Bakteriostatski učinak Stimulacija angiogeneze i metabolizam lipida Imunomodulatorni učinak Smanjuje proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva
C-reaktivni protein	Pozitivan	Aktivacija komplementa i opsonizacija Modulacija monocita i makrofaga, produkcija citokina Vežanje kromatina Sprječavanje migracije neutrofila u tkivo
Serum amyloid A	Pozitivan	Transport kolesterola iz odumrlih stanica u hepatocite Smanjuje proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva Inhibicija imunološkog odgovora Kemotaktički učinak na monocite, polimorfonuklearne leukocite i T stanice Indukcija mobilizacije kalcija u monocitima Inhibicija aktivacije trombocita
Fibrinogen	Pozitivan	Koagulacija Sudjeluje u cijeljenju rana Potpora staničnoj adheziji
Alfa-1-antitripsin	Pozitivan	Inhibicija proteaza Zaštita tkiva od oštećenja tijekom upale
Hemopeksin	Pozitivan	Vežanje slobodnog hema Zaštita od oksidativnog stresa
Ceruloplazmin	Pozitivan	Enzim s oksidaznom aktivnošću (ferooksidaza) Oksidira Fe^{2+} u Fe^{3+} i tako omogućava vežanje željeza za transferin Antioksidativna funkcija Sudjeluje u transportu bakra u organizmu
Albumin	Negativan	Održava koloidno onkotski tlak u plazmi Transportira molekule Antioksidativna svojstva Povezuje i detoksificira toksične metabolite i slobodne radikale Djeluje kao puferski sustav u regulaciji pH
Transferin	Negativan	Vežanje i transport željeza u plazmi Bakteriostatski učinak Regulira unos željeza u stanice Sudjeluje u održavanju homeostaze željeza

Prilikom procjene intenziteta reakcije akutne faze uočeno je da se odgovor akutne faze može detektirati nekoliko dana nakon podražaja, ali kinetika odgovora ovisi o vrsti organizma i o razmjerima oštećenja tkiva (KUSHNER i MACKIEWICZ, 1987.; MACKIEWICZ i sur., 1993.). Maksimalna koncentracija proteina akutne faze u serumu obično se postiže unutar 24 do 48 sati nakon početka reakcije, dok pad koncentracije proteina često nastupa tijekom oporavka od infekcije (ECKERSALL i BELL, 2010.). Odgovor reakcije akutne faze ograničen je mehanizmom

povratne sprege što dovodi do njegovog smirivanja unutar četiri do sedam dana nakon početnog podražaja u slučaju ako ne dođe do daljnjih podražaja.

U stanjima gdje je prisutna kronična upala kao što je kod artritisa, smatra se da je organizam izložen uzastopnim nizom zasebnih upalnih podražaja. U takvim stanjima povećane koncentracije proteina akutne faze u serumu obično se uočavaju (ECKERSALL i sur., 2007.), ali porast je značajno manji nego tijekom akutnih epizoda upale ili infekcije. Također postoje pokazatelji da odgovor na kroničnu u usporedbi s akutnom upalom varira od jednog proteina do drugog.

2.4.1. Haptoglobin

Haptoglobin je glavni protein akutne faze kod ovaca. Spada u skupinu plazmatskih transportnih (metal-vezujućih) pozitivnih proteina akutne faze, a prvi puta je opisan 1938. godine (POLONOVSKI i JAYLE, 1938.). Građen je od dvaju peptida mase 20 kDa (α -lanci) i dvaju peptida mase 35 kDa (β -lanci), međusobno povezanih disulfidnim vezama (MORIMATSU i sur., 1991.). Pročišćeni nativni Hp ima molekularnu masu od 1000 do 2000 kDa, a stabilna jedinica je $\alpha_2\beta_2$ tetramer. Uglavnom se sintetizira u jetri, a uočena je da se može sintetizirati iako u drugim tkivima poput pluća, kože, slezene, bubrega i masnog tkiva (D'ARMIENTO i sur., 1997.; YANG i sur., 2003.). Na proizvodnju Hp-a utječu brojni čimbenici, uključujući hormon rasta, inzulin, bakterijske endotoksine, prostaglandine i proupalne citokine, osobito IL-1, IL-6 i TNF- α . (RAYNES, 1994.). Većina bioloških aktivnosti Hp ne povezuje se s čistim, izoliranim oblikom, već s nastankom kompleksa Hp-Hb. Prema Yangu (2003.), a što su potvrdila i kasnija istraživanja Kato (2009.), najvažnija funkcija Hp je vezanje slobodnog hemoglobina. Budući da je kompleks Hp-Hb izrazito velik, ne može proći kroz glomerule bubrega te se odstranjuje ključivo putem retikuloendotelnog sustava vezanjem na CD163 receptore koji se nalaze na površini makrofaga i monocita, osobito na Kupfferovim stanicama jetre (SCHAER i sur., 2002.). Vrijeme poluraspada kompleksa Hp-Hb je između 20 do 50 minuta (CECILIANI i sur., 2012.). Koncentracija Hp ne raste u slučajevima kada dolazi do razgradnje eritrocita u slezeni ili jetri no kada se razgradnja odvija u krvnim žilama značaj je porast koncentracije Hp (JAIN i sur., 2011.).

Uslijed raspadanja eritrocita u krvotoku se nalazi hemoglobin koji je toksičan i značajna je njegova oksidacijska aktivnost. Također je važno istaknuti da osim oksidativne toksičnosti, slobodni hemoglobin može brzo i nepovratno vezati dušikov oksid (NO), pri čemu oduzima NO

iz cirkulacije i smanjuje njegovu biološku dostupnost (ROTHER i sur., 2005.). Vezanjem kompleksa Hp-Hb sprječava se stvaranje slobodnih kisikovih radikala te se smanjuju oksidativna oštećenja povezana s hemolizom što definira njegovu antioksidativnu funkciju (SMITH i ROBERTS, 1994.; MURATA i sur., 2004.). Bakteriostatski učinak Hp proizlazi iz stvaranja kompleksa Hp-Hb, pri čemu željezo, koje je ključno za rast bakterija, postaje nedostupno patogenima (CECILIANI i sur., 2012.). Haptoglobin (Hp) ima značajnu imunomodulacijsku i protuupalnu ulogu, pri čemu može inhibirati proliferaciju mastocita, izravno djelovati na efektorske stanice vezanjem na CD11/CD18 receptor te suzbijati proliferaciju T-limfocita. (EL GHMATI i sur., 1996.; MURATA i sur., 2004.). Haptoglobin ima sposobnost moduliranja upalnih procesa na više razina. Kada kompleks Hp-Hb veže CD163 receptore na monocitima i makrofazima, potiče se ekspresija protuupalnih molekula, kao što su inducibilna heme-oksigenaza-1 (HO-1) i interleukin 10 (IL-10), što rezultira aktivacijom protuupalnog odgovora (PHILIPPIDIS i sur., 2004.; SCHAER i sur., 2006.). Haptoglobin ima značajnu ulogu u angiogenezi, a osobito se ističe njegova zaštitna (chaperonska) funkcija, zahvaljujući sposobnosti vezanja različitih proteina, uključujući citrat sintazu, glutation-S-transferazu, lizozim i ovotransferin pri čemu sprječava njihovu agregaciju i taloženje izazvano stresom ili povišenom temperaturom (YERBURY i sur., 2005.).

2.5. Kopeptin, novi biološki pokazatelj patofiziologije akutnog stresnog odgovora

Kopeptin je prvi put opisan 1972. godine od strane Holwerde, kada je identificiran kao glikozilirani peptid iz stražnjeg režnja hipofize svinje. Sastoji se od 39 aminokiselina, molekulske mase približno 5 kDa, te pripada leucin-bogatoj jezgri C-terminalnog dijela prekursora arginin-vazopresina (pro-AVP) (FENSKE i sur., 2018.). Razvoj radioimunološkog testa omogućio je precizno određivanje kopeptina iz pro-AVP-a u koncentracijama koje su u skladu s mjerenjima difuzije prekursora i njegovih peptida (KATAN i CHRIST-CRAIN, 2010.). U fiziološkim i patološkim uvjetima, koncentracije arginin vazopresina (AVP) i kopeptina u plazmi su međusobno usklađene, dok osmolalnost plazme ostaje u granicama normale. Kopeptin i AVP izlučuju se u jednakim omjerima iz stražnjeg režnja hipofize kao odgovor na osmotske i hemodinamske podražaje (EVERS i WELLMANN, 2018.). Sinteza AVP-a se može odvijati i u parvocelularnim neuronima hipotalamusa te zajedno s CRH putem portalne cirkulacije dopijeva do adenohipofize, gdje sinergijskim djelovanjem s CRH-om stimulira sekreciju ACTH koji potom potiče koru nadbubrežne žlijezde na lučenje glukokortikoida. Ova osovinska interakcija AVP-a i CRH-a predstavlja ključni mehanizam u neuroendokrinnoj regulaciji stresnog odgovora (VAN GASTEL i sur., 2015.). AVP ima ključnu ulogu u regulaciji ravnoteže tjelesnih tekućina i vaskularnog tonusa, ali njegovo laboratorijsko određivanje predstavlja značajan izazov. Unatoč njegovom kliničkom značaju, točno mjerenje razine AVP-a predstavlja problem. Oko 90% cirkulirajućeg AVP-a veže se za trombocite, što dodatno otežava kvantifikaciju. Osim toga, AVP ima vrlo kratak poluživot (<30 minuta), nisku molekularnu stabilnost i brzo se razgrađuje čak i pri niskim temperaturama, što znatno ograničava njegovu primjenu kao dijagnostičkog biomarkera (GONZALEZ i sur., 2020.). Nasuprot tome, kopeptin, koji se izlučuje u ekvimolarnim količinama zajedno s AVP-om, pokazuje znatno veću stabilnost u plazmi i višu koncentraciju u cirkulaciji, što ga čini pouzdanim biološkim pokazateljem za neizravnu procjenu razine AVP-a (ŁUKASZYK i MAŁYSZKO, 2015.).

S obzirom da je bol stresna komponenta koja aktivira HPA osovinu i vazopresinski sustav, praćenje koncentracije kopeptina koji se izlučuje u istim omjerima kao i AVP, ali je znatno stabilnija molekula, čini ovaj biološki pokazatelj značajnim u procjeni akutnog stresnog odgovora.

AVP i kopeptin imaju ključnu ulogu u regulaciji ravnoteže vode i srčane funkcije, a kopeptin, kao stabilni dio prohormona AVP-a, omogućuje pouzdanije praćenje aktivacije

vazopresinskog sustava nakon oštećenja srca (OZMEN i sur., 2021.). Kopeptin se pokazao kao vrlo učinkovit prognostički pokazatelj u srčanim i plućnim bolestima, a u nekim slučajevima nadmašuje NT-proBNP u predviđanju kratkoročne smrtnosti, primjerice kod ozljede pluća, kardiopulmonalnog edema i akutnog respiratornog distress sindroma (eng. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS). KATAN i CHRIST-CRAIN (2010.) izvijestili su da kopeptin može imati prediktivnu vrijednost u stratifikaciji rizika za buduće ishemijske događaje, budući da su samo povišene razine kopeptina (a ne kortizola) bile povezane s ponavljajućim cerebrovaskularnim incidentima, uključujući moždani udar i prolazni ishemijski napad (MONTELLANO i sur., 2021.). Njegova šira uloga u metaboličkim i bubrežnim poremećajima potvrđuje povezanost povišenih razina kopeptina s mikroalbuminurijom, kao i s osovine razvoja šećerne bolesti i pretilosti, iako ne i s cjelokupnim spektrom metaboličkog sindroma (ENHÖRNING i sur., 2013.). U diferencijalnoj dijagnostici između cerebralnog gubitka soli i sindroma neprimjerene sekrecije antidiuretskog hormona (SIADH), kopeptin je dao ohrabrujuće rezultate. Iako povišene razine AVP-a u SIADH uzrokuju hiponatrijemiju i povećanu osmotsku vrijednost urina, omjer kopeptina i natrija u urinu pokazao se točnijim dijagnostičkim pokazateljem, zahvaljujući značajnom preklapanju apsolutnih vrijednosti kopeptina u navedenim stanjima (FENSKE i sur., 2009.). Kao pouzdan biološki pokazatelj aktivacije vazopresinskog sustava, kopeptin pruža vrijedan uvid u hemodinamsku stabilnost, potencijalnu ozljedu organa (srce, bubrezi), te posljedice operacijskog stresa ili boli.

2.6. Utjecaj intraoperacijske analgezije na akutni stresni odgovor

2.6.1. Opioidni analgetici

Sistemske opioide smanjuju lučenje ACTH i GH inhibicijom otpuštanja CRH na razini hipotalamusa. U kardijalnoj kirurgiji primijećeno je da visoke doze opioida, primijenjene prije uvođenja kardiopulmonalne premosnice mogu potpuno smanjiti lučenje ACTH-a i kortizola. Sličan učinak zabilježen je i u abdominalnoj kirurgiji, kada se opioide apliciraju prije kožnog reza prilikom operacije odstranjenja žučnjaka otvorenom tehnikom (DESBOROUGH, 2000.). Uočeno je da iznimno visoke doze opioidnih analgetika (fentanil $>50 \mu\text{g kg}^{-1}$) mogu u potpunosti spriječiti hormonski odgovor kod operacija zdjelice i abdominalne kirurgije. Međutim, ovakve doze značajno produžuju buđenje iz anestezije i obično zahtijevaju poslijeoperacijsku strojnu potporu. Sistemske opioide također mogu ublažiti hiperglikemijski odgovor na operaciju (PAOLA i sur., 2015.).

Morfij, fentanil, remifentanil, metadon i kodein pokazuju imunomodulacijska svojstva, dok oksikodon, tramadol, hidrokodon i buprenorfin ne iskazuju takav učinak (AL-HASHIMI i sur., 2013.). Jedna od mogućih hipoteza koja objašnjava ovu razliku temelji se na različitim afinitetima opioida prema μ -, κ - i δ -opioidnim receptorima te njihovim različitim posredovanim signalnim putovima koji utječu na imunološki odgovor. Morfij ima imunosupresivne učinke koji ovise o dozi i uključuju smanjenu funkciju monocita i neutrofila, inhibiciju citotoksičnosti posredovane stanicama prirodnim ubojicama, NK-stanicama (eng. Natural Killer, NK), smanjenje oslobađanja citokina te inhibiciju proliferacije limfocita i makrofaga (CRUZ i sur., 2017.).

Metadon se pokazao pogodnim za dugotrajno liječenje boli, osobito u perioperacijskom razdoblju, pri čemu se ističe relativno blagim imunosupresivnim učinkom i dodatnim antagonističkim djelovanjem na N-metil-D-aspartatne (NMDA) receptore. Ne utječe značajno na fagocitozu i NK-aktivnost, ali blago smanjuje IL-6 te može potaknuti imunoregulaciju kod autoimunih stanja (FRANCHI i sur., 2019.). U modelu autoimunog encefalomijelitisa kod miševa, metadon je značajno smanjio kliničke znakove, infiltraciju upalnih stanica u leđnu moždinu i razinu upalnih citokina, što ukazuje na njegov imunomodulacijski učinak (KAFAMI i sur., 2013.).

Ninnemann i suradnici (2024.) u svom istraživanju navode da metadon snažno inhibira funkciju T-limfocita, uključujući proliferaciju i izlučivanje pro-upalnih citokina, učinak je jači nego kod heroína. Međutim, zbog svoje farmakokinetičke varijabilnosti i potencijala za interakcije s drugim lijekovima, njegova primjena zahtijeva pažljivo titriranje doze i kliničko praćenje bolesnika.

Fentanil, s druge strane, idealan je za kratkotrajnu, brzu analgeziju tijekom operacijskih zahvata. Učinkovito smanjuje neuroendokrini odgovor na stres, osobito pri većim dozama. Doze od približno 15 µg/kg i više, primijenjene u ranoj fazi operacije (npr. tijekom indukcije u anesteziju), mogu značajno smanjiti lučenje ACTH i kortizola, čime se smanjuje razina hormona stresa intraoperativno i nekoliko sati postoperativno. Osim toga, fentanil potiskuje porast β-endorfina, posredno inhibirajući odgovor hipofize na stres tijekom operacijskih zahvata u području zdjelice (LACOUMENTA i sur., 1987.). Također smanjuje porast glukoze u krvi te koncentracije hormona poput GH, ACTH-a i kortizola, što je izraženije u usporedbi s inhalacijskim anestetikima.

2.6.2. Regionalna anestezija

Primjena neuraksijalne analgezije uz uporabu lokalnih anestetika blokira endokrini i metabolički odgovor na stres tijekom operacijskih zahvata. Primjena lokalnog anestetika u epiduralni prostor sprječava prijenos impulsa putem spinalnih živaca, čime se blokira prijenos boli, kao i drugih osjetnih, motoričkih i simpatičkih impulsa. Mehanizam djelovanja neuraksijalne anestezije temelji se na inhibiranju odgovora HPA-osi blokiranjem aferentne aktivacije hipotalamusa te eferentne stimulacije jetre, nadbubrežnih žlijezda i gušterače. Uslijed blokade HPA-osi dolazi do smanjenog lučenja ACTH, kortizola, adrenalina i GH (IWASAKI i sur., 2015.). Prednosti regionalnih tehnika u odnosu na opću anesteziju uključuju brži povratak gastrointestinalne funkcije, manju učestalost plućnih komplikacija, smanjeni upalni odgovor na kiruršku traumu te bolja kontrola hemostaza.

Epiduralna anestezija u kombinaciji s općom anestezijom kod abdominalnih zahvata u području T4–S5 izaziva mnogi porast koncentracija kortizola i adrenalina u urinu tijekom zahvata, u usporedbi s isključivo općom anestezijom (DESBOROUGH, 2000.). Istraživanja su pokazala da torakalna epiduralna anestezija u kombinaciji s općom anestezijom može potisnuti odgovor kateholamina tijekom ugradnje kardiopulmonalne prenosnice do 24 sata nakon operacije. Sažlik

i sur. (2015.) u svom istraživanju učinka epiduralne anestezije tijekom artroplastike kuka i koljena prikazali su rezultate koji ukazuju da je epiduralna anestezija u kombinaciji s općom anestezijom potisnula stresni odgovor, što je procijenjeno pomoću razina ACTH-a, kortizola i hemodinamskih pokazatelja no navode kako ova metoda nije bila učinkovita u smanjenju porasta razine glukoze i inzulina. Epiduralna anestezija pokazuje značajan imunomodulacijski i protuupalni učinak, što se očituje u nižim razinama serumski prisutnih pro-upalnih citokina, uključujući IL-6, TNF- α i CRP-a, u bolesnika koji su podvrgnuti kombinaciji epiduralne i opće anestezije u usporedbi s onima koji su bili podvrgnuti isključivo općoj anesteziji (LIN i sur., 2025.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

U modernoj medicini sve se više prepoznaje važnost pravovremenog prepoznavanja i modulacije perioperacijskog stresnog odgovora. Operacijski stres, posebice kada je praćen neodgovarajućom analgezijom, može potaknuti snažan neuroendokrini i upalni odgovor, što posljedično može dovesti do oštećenja tkiva, poremećaja imunološke funkcije, usporenog cijeljenja te većeg rizika od postoperacijskih komplikacija. U tom smislu rana identifikacija bioloških pokazatelja stresa, poput kortizola, kopeptina i haptoglobina, ima značajnu dijagnostičku i prognostičku vrijednost te je ključna za pravovremenu procjenu fiziološkog odgovora organizma i smanjenje rizika od sekundarnih komplikacija. Ovi pokazatelji omogućuju objektivnu procjenu intenziteta stresnog odgovora te pomažu u odabiru optimalne analgetske strategije koja može spriječiti prekomjerni upalni i hormonski odgovor organizma na operacijski podražaj. S obzirom da analgezija predstavlja ključni alat za kontrolu kirurške boli i stresa, od osobite je važnosti istražiti i usporediti različite modele intraoperacijske analgezije u pogledu njihovog učinka na rane pokazatelje stresa. Ova disertacija pridonosi tom području ispitivanjem učinaka metadona, fentanila i epiduralne analgezije levobupivakainom na koncentracije stresnih bioloških pokazatelja u serumu ovaca nakon standardiziranog operacijskog zahvata.

Na temelju dosadašnjih spoznaja, prije početka istraživanja postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Vrijednosti kopeptina bit će u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima kortizola i haptoglobina, koji služe kao pokazatelji stresa kod ovaca tijekom i nakon artrotomije koljena.
2. Epiduralna primjena levobupivakaina imat će izraženiji analgetski učinak u usporedbi s intravenskom primjenom metadona i fentanila, što će se očitovati manjim porastom vrijednosti kortizola, kopeptina i haptoglobina.

Sukladno navedenom, postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Izmjeriti vrijednosti kortizola, kopeptina i haptoglobina u serumu za vrijeme artrotomije koljenog zgloba u ovaca, ovisno o primijenjenom intraoperacijskom protokolu
2. Analizirati korelacije vrijednosti kortizola, kopeptina i haptoglobina ovisno o primijenjenom intraoperacijskom protokolu

3. Istražiti povezanost laboratorijskih pokazatelja krvi i hemodinamskih promjena s mjerenim pokazateljima akutnog stresnog odgovora
4. Odrediti intraoperacijski analgetski protokol s najmanjim akutnim stresnim odgovorom

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Bioinženjerski transplantati za obnovu hrskavice u bolesnika (engl. *Bioengineered grafts for cartilage healing in patients*, BIO-CHIP) projekt i primjena tkivnog inženjeringa na animalnom modelu

BIO-CHIP predstavlja međunarodni znanstveno-istraživački projekt u okviru programa Obzor 2020, čiji je cilj razvoj inovativnih terapijskih rješenja za regeneraciju zglobne hrskavice. Istraživanje pod nazivom „Regeneracija suprotstavljenih (*kissing*) defekata zglobne hrskavice u koljenu primjenom terapije temeljene na nosnim hondrocitima – tkivno-inženjerski pristup (engl. *nasal chondrocyte-derived engineered cartilage*, N-TEC) ili stanična terapija (engl. *nasal chondrocyte delivery from a matrix*, N-CAM)” provodi se s ciljem ispitivanja učinkovitosti terapija baziranih na nosnim hondrocitima u regeneraciji hrskavice u biomehanički izazovnim uvjetima, kakvi su prisutni, između ostalog, i kod osteoartritisa. Nositelj projekta je Medicinski fakultet, uz podršku partnerskih institucija: Veterinarskog fakulteta, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Kliničke bolnice "Sveti Duh" kao pridružene strane. Kao sastavni dio projekta provedena je pretklinička studija na animalnom modelu, u kojoj je testirana učinkovitost nove metode transplantacije hrskavičnih presađaka kod kompleksnih, velikih i višestrukih oštećenja zglobne hrskavice. Ova studija predstavlja rezultat suradnje nekoliko domaćih istraživačkih skupina i važan je korak prema kliničkoj primjeni metode u humanoj medicini.

U središtu ove tehnologije nalazi se tkivni inženjering, interdisciplinarno područje koje povezuje biologiju, inženjerstvo i medicinu. Cilj mu je regeneracija ili zamjena oštećenih tkiva i organa korištenjem živih stanica u kombinaciji s biomaterijalima. Jedan od konkretnih pristupa uključuje laboratorijski uzgoj stanica nosne hrskavice koje se zatim množe u kontroliranim uvjetima sve dok ne formiraju novi hrskavični presađak, spreman za transplantaciju u koljeno bolesnika. Zahvat se izvodi minimalno invazivno, a nova hrskavica preuzima funkciju oštećenog tkiva i potiče njegovu regeneraciju.

Model ovce kao pokusne životinje odabran je kako bi se osigurali uvjeti u kojima se ispitivani lijekovi mogu testirati u okruženju koje mehanički i fiziološki odgovara stanju kod čovjeka nakon transplantacije. Takvi uvjeti nisu ostvarivi u modelima malih životinja. Dodatno, anatomske karakteristike ovčjeg koljena omogućuju stvaranje oštećenja većih dimenzija (promjera

6-7 mm) u odnosu na ukupnu površinu zgloba, pri čemu je poznato da takva oštećenja spontano ne cijele. Odabir ovčjeg modela utemeljen je i na prethodnom iskustvu istraživačkog tima s ovom životinjskom vrstom, kao i na njenoj praktičnosti, dostupnosti i povoljnijim troškovima u usporedbi s drugim modelima velikih životinja.

4.2. Metodološki raspored istraživanja

Eksperimentalni protokol proveden je u tri zasebne faze (Slika 2.). Tijekom svake pojedine faze životinje su privremeno bile smještene na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su provedeni svi planirani zahvati i uzorkovanja. U razdobljima između pojedinih faza, ovce su bile smještene na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu, pod stalnim veterinarskim nadzorom doktora veterinarske medicine, čime su osigurani odgovarajući uvjeti držanja, prehrane i zdravstvene skrbi sukladno standardima dobrobiti životinja.

Prva faza uključivala je uzimanje uzoraka hrskavičnog tkiva nosne pregrade metodom biopsije te izdvajanje hondrocita za potrebe daljnje *in vitro* kultivacije. Cilj ove faze bio je priprema i uzgoj autolognih tkivnih presađaka u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Druga faza započela je između 16. (N-CAM) i 28. (N-TEC) dana nakon izolacije hondrocita, ovisno o eksperimentalnoj skupini kojoj su životinje pripadale. Tijekom ove faze provedena je ugradnja prethodno uzgojenih autolognih tkivnih presađaka u oštećenja hrskavice zgloba bedrene kosti i čašice.

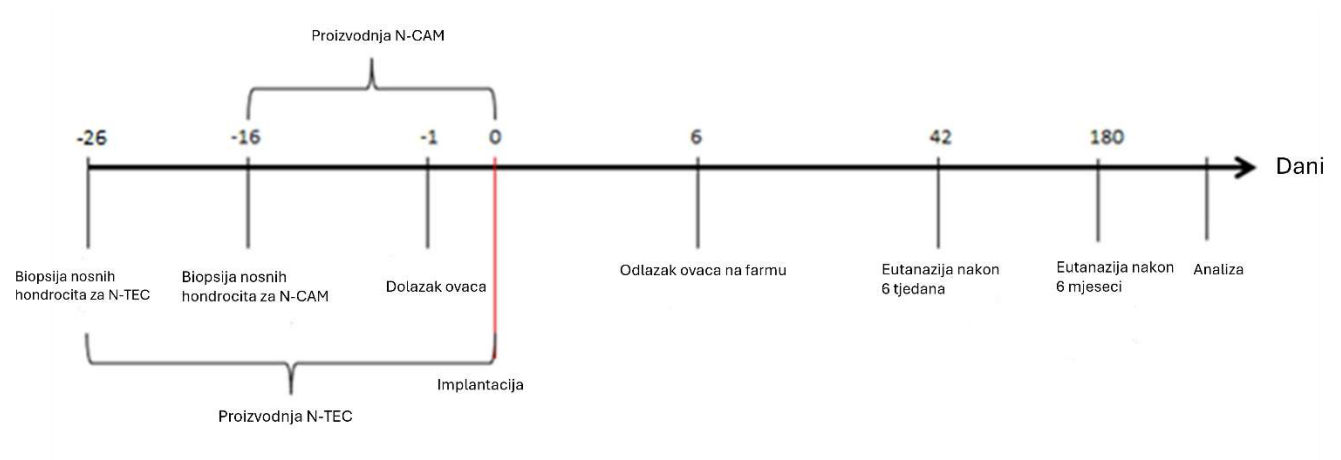
Treća faza pokusa obuhvaćala je eutanazije životinja u skladu s etičkim smjernicama, nakon čega je provedena eksplantacija oba koljena radi daljnjih histoloških, histokemijskih i molekularnih analiza regeneracije hrskavičnog tkiva.

Dizajn istraživanja uključivao je tri eksperimentalne skupine, od kojih je svaka sadržavala po 10 jedinki.

U kontrolnoj skupini ($n = 10$), u prethodno izrađeno oštećenje zglobne hrskavice ugrađen je samo acelularni kolagenski nosač (Chondro-Gide®, Geistlich Pharma AG, Švicarska).

U eksperimentalnoj skupini 1 ($n = 10$), na istovjetnom mjestu i veličini oštećenja, ugrađeni su hrskavični presađci nazalnih hondrocita na nosaču po protokolu N-TEC.

U eksperimentalnoj skupini 2 ($n = 10$), ugrađeni su hrskavični presadci nazalnih hondrocita na nosaču po protokolu N-CAM.



Slika 2. Vremenski slijed postupaka pokusa

Dio životinja u svakoj skupini eutanaziran je u dva vremenska intervala: 6 tjedana i 6 mjeseci nakon ugradnje presadaka. Nakon eutanazije, učinjena je eksplantacija tkiva koja su podvrgnuta daljnjoj analizi.

4.3. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno uz prethodno odobrenje Povjerenstva za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (EP 58/2016; klasa 130-03/15-011418) te Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe pri Ministarstvu poljoprivrede Republike Hrvatske (Rješenje KLASA broj: UP /I-322-01/16-01/04). Životinje korištene tijekom pokusa nabavljene su iz istog ovlaštenog uzgoja.

U svrhu ovog istraživanja korišteni su podaci i serumski uzorci ukupno 30 ovaca koje su bile podvrgnute istovrsnom kirurškom zahvatu u uvjetima opće anestezije. Životinje su raspoređene u tri eksperimentalne skupine, svaka s po 10 jedinki, pri čemu je raspodjela provedena nasumičnim odabirom. U istraživanje su uključene ovce ženskog spola, križane pasmine, prosječne starosti između 2,5 i 3 godine, te tjelesne mase od 50 do 60 kilograma.

Sve životinje podvrgnute su istovrsnom operacijskom zahvatu u uvjetima opće anestezije. Prijeoperacijski protokol, anesteziološki postupci i analgezija bili su jednaki za sve životinje uključene u istraživanje ovisno o skupini kojoj pripadaju. Sve ovce prethodno su podvrgnute vitaminizaciji i dehelmintizaciji te testirane na najčešće zoonotske bolesti te su svi nalazi bili negativni. Nakon uvođenja u anesteziju, a prije operacijskog zahvata primijenjena je antibiotska profilaksa. Sve operacije izvedene su u aseptičnim uvjetima od strane istog tima veterinara, specijaliziranih za rad s pokusnim životinjama, na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.4. Anestezija i analgezija za vrijeme artrotomije koljena ovce

Sve životinje dostavljene su na Veterinarski fakultet u skladu s važećim propisima. Ovce su, u grupama po četiri, dovezene na Kliniku za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 24 sata prije zahvata, radi aklimatizacije na novu okolinu, oporavak od transporta i smanjenja stresa.

Prilikom dolaska na Kliniku sve ovce su izvagane te je obavljen opći klinički pregled životinje. Životinje kod kojih su prilikom općeg pregleda utvrđene kliničke ili fiziološke promjene koje bi mogle utjecati na rezultate istraživanja isključene su iz studije. Hrana im je bila uskraćena 12 sati prije anestezije uz slobodan pristup vodi.

Ovce su sedirane u boksu, a postupak sedacije bio je jednak za sve životinje. Intramuskularna sedacija provedena je primjenom kombinacije ksilazina (Xylapan, Vetoquinol, Belp Bern, Švicarska) u dozi od 0,1 mg/kg i ketamina (Narketan, Vetoquinol, Belp Bern, Švicarska) u dozi od 5 mg/kg. Nakon što su životinje sedirane u boksevima, u glavnu podlaktičnu venu (lat. v. *cephalica antebrachia*) svake ovce postavljena je intravenska kanila (Vasofix® Certo 20G, 1,1 × 33 mm; B. Braun Melsungen AG, Njemačka). Potom je intravenski primijenjen diazepam (Apaurin; Krka-Farma d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u dozi od 0,2 mg/kg. Za uvođenje u anesteziju korišten je tiopental (Thiopental Injection BP 500 mg; Rotexmedica, Trittau, Njemačka) u dozi od 5–10 mg/kg, ovisno o individualnom odgovoru životinje. Nakon postignute odgovarajuće dubine anestezije, ovce su endotrahealno intubirane pomoću endotrahealnog tubusa (ETT) (VentiSeal™, Flexicare Medical Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Nakon intubacije i pripreme operacijskog polja prema standardnim postupcima sve ovce su postavljene u ležeći položaj na operacijski stol te spojene na anesteziološki uređaj (Datex-Ohmeda Aespire View; Datex Ohmeda Inc., SAD). Anestezija je održavana inhalacijskom primjenom izoflurana u koncentraciji 1–2% (Isoflurin® 1000 mg/g; Vetpharma Animal Health, S.L., Španjolska), u smjesi kisika i medicinskog zraka. Za vrijeme anestezije, životinje su bile pod stalnim nadzorom anesteziologa, koji je, prema procjeni vitalnih funkcija te hemodinamskih promjena, podešavao doze anestetika i analgetika te kontrolirao dubinu anestezije.

Životinje su raspoređene u tri eksperimentalne skupine (n = 10 po skupini), koje se međusobno razlikuju prema načinu provođenja intraoperacijske analgezije.

Skupini 1 pripadaju životinje gdje se intraoperacijska analgezija provodila intravenskom primjenom metadona u dozi od 0,1 mg/kg tijekom indukcije anestezije. Tijekom operacijskog zahvata, dodatni bolusi metadona u dozi od 0,1 mg/kg i.v. primjenjivali su se prema potrebi, u slučaju intraoperacijske boli.

Skupina 2 su životinje kod kojih je intraoperacijska analgezija osigurana kontinuiranom intravenskom infuzijom fentanila u dozi od 0,1–0,5 µg/kg/min, započetom pri ulasku u operacijsku salu te nastavljanom do završetka kirurške intervencije (posljednjeg kožnog šava). Prije početka kontinuirane infuzije fentanila, tijekom uvođenja u anesteziju primjenjivan je početni bolus fentanila u dozi od 2 µg/kg i.v. Doziranje fentanila tijekom operacije individualno se prilagođavalo prema procjeni razine boli.

Skupinu 3 čine životinje kojima je intraoperacijska analgezija osigurana epiduralnom primjenom lokalnog anestetika levobupivakaina u dozi od 1 mg/kg, primijenjenog putem spinalne igle u lumbosakralni epiduralni prostor.

Za vrijeme trajanja opće anestezije, hemodinamska stabilnost osigurana je kontinuiranom intravenskom infuzijom izotonične, kristaloidne Ringerove otopine (B. Braun Ringer's Solution, Ecoflac® plus; B. Braun Melsungen AG, Njemačka) u brzini od 10 ml/kg/h. Za perioperacijsku antibiotsku profilaksu intravenski je primijenjen cefazolin (Zepilen; Medochemie/Medicuspharma, Zagreb, Hrvatska) u dozi od 20 mg/kg, 15 do 30 minuta prije kirurške incizije. Primjena je provedena jednokratno, kako bi se postigla odgovarajuća koncentracija antibiotika u tkivima tijekom zahvata. U slučaju da je od primjene antibiotika prošlo 90 minuta, a operacijski zahvat nije završen, primjena antibiotika je bila ponovljena u istoj dozi.

U poslijeoperacijskom razdoblju protokol analgezije za sve ovce bio je jednak. Primijenjen je nesteroidni protuupalni lijek meloksikam (Meloxidolor 20 mg/ml otopina, Genera, Zagreb, Hrvatska) u početnoj dozi od 0,2 mg/kg intramuskularno, a zatim tijekom naredna četiri dana u dozi od 0,1 mg/kg intramuskularno jednom dnevno. Analgezija se održavala meloksikamom tijekom ukupno pet postoperacijskih dana prema navedenom režimu.

4.5. Nadzor ovaca tijekom anestezije

U operacijskoj sali ovce su priključene na anesteziološki aparat (Datex-Ohmeda Aespire View, Datex-Ohmeda Inc., SAD) pomoću Y-cijevi, a nadzor vitalnih funkcija provodio se putem anesteziološkog monitora (B30 Patient Monitor, GE Healthcare, SAD). Srčana frekvencija (eng. *Heart rate*, HR) i ritam bilježeni su elektrokardiografijom (EKG), dok je periferna zasićenost hemoglobina kisikom (SpO₂) praćena pulsnom oksimetrijom. Tjelesna temperatura (TT) mjerena je pomoću sonde smještene u jednjak. Respiracijska frekvencija (eng. *Respiratory rate*, RR) i koncentracija ugljikovog dioksida u izdahnutom zraku (EtCO₂) kontinuirano su nadzirane kapnografom. Nakon toga, u aurikularnu arteriju svake životinje uvedena je arterijska kanila (Vasofix® Certo 20 G, 1,1 x 33 mm, B. Braun Melsungen AG, Njemačka) u svrhu invazivnog praćenja arterijskog tlaka. Kanila je spojena s anesteziološkim monitorom preko pretvarača tlaka (Meritrans DTXPlus®, Merit Medical Ireland Ltd., Irska), postavljenog u visini desne pretkljetke srca. Pretvarač tlaka prethodno je baždaren tako da je tlak unutar mjerne komore bio u ravnoteži s atmosferskim tlakom, čime je vrijednost 0 mm Hg odgovarala referentnom tlaku. Nakon kalibracije započeto je kontinuirano, invazivno mjerenje arterijskog tlaka. Za potrebe neinvazivnog mjerenja arterijskog tlaka kod ovaca primijenjena je oscilometrijska metoda, pri čemu je manžetna odgovarajuće širine (35–45 % opsega uda) postavljena na srednji ili distalni dio podlaktice s pokazivačem pravilno pozicioniranim iznad palčane (lat. *a. radialis*) ili lakatne (lat. *a. ulnaris*). Mjerenja su se provodila u intervalima od 2 do 5 minuta, a radi provjere točnosti istovremeno su bilježena i invazivna očitavanja arterijskog tlaka, kako bi se omogućila validacija oscilometrijskih vrijednosti.

Tijekom trajanja opće anestezije i operacijskog zahvata, hemodinamski pokazatelji sustavno su praćeni u točno definiranim vremenskim intervalima, koji su predstavljali specifične vremenske točke unutar trajanja anestezije. Zabilježeni su respiracijska frekvencija, srčana frekvencija, invazivno izmjerene vrijednosti sistoličkog (iSAT) i dijastoličkog arterijskog tlaka (iDAT), kao i neinvazivno izmjerene vrijednosti sistoličkog (niSAT) i dijastoličkog arterijskog tlaka (niDAT). Uz to, kontinuirano je praćena koncentracija ugljikovog dioksida u izdahnutom zraku (EtCO₂). U istim vremenskim točkama procjenjivan je promjer zjenice oka, dok je intraokularni tlak mjeren neinvazivnom metodom, pri čemu su u svakoj točki provedena tri

uzastopna mjerenja od kojih se zatim uzela srednja vrijednost. Vremenske točke označene su sljedećim redoslijedom i opisom:

15 - 15 minuta nakon premedikacije

20 - nakon uvoda u anesteziju

40 - prije kožnog reza

45 - nakon kožnog reza

60 - 15 minuta nakon kožnog reza

75 - 30 minuta nakon kožnog reza

4.6. Mjerenje intraokularnog tlaka i promjera zjenice

Neinvazivno mjerenje intraokularnog očnog tlaka (IOT) kod ovaca provedeno je prijenosnim tonometrom Tono-Pen, koji se temelji na tehnologiji elektroničkih mjerača naprezanja i načelu spljoštavanja (aplanacije) rožnice (Slika 3). Tono-Pen radi na principu McKay–Marg tonometrije, pri čemu se mali pokretni klip nježno postavlja na površinu rožnice, a sila potrebna za njezino spljoštavanje (aplanaciju) bilježi se pomoću elektroničkog mjernog pretvornika. Navedeni pretvornik registrira promjene električnog napona koje zatim uređaj pretvara u brojčane vrijednosti intraokularnog tlaka. Uređaj automatski izvršava više očitavanja te prikazuje prosječnu vrijednost zajedno sa statističkim indeksom pouzdanosti (standardna devijacija/COV).

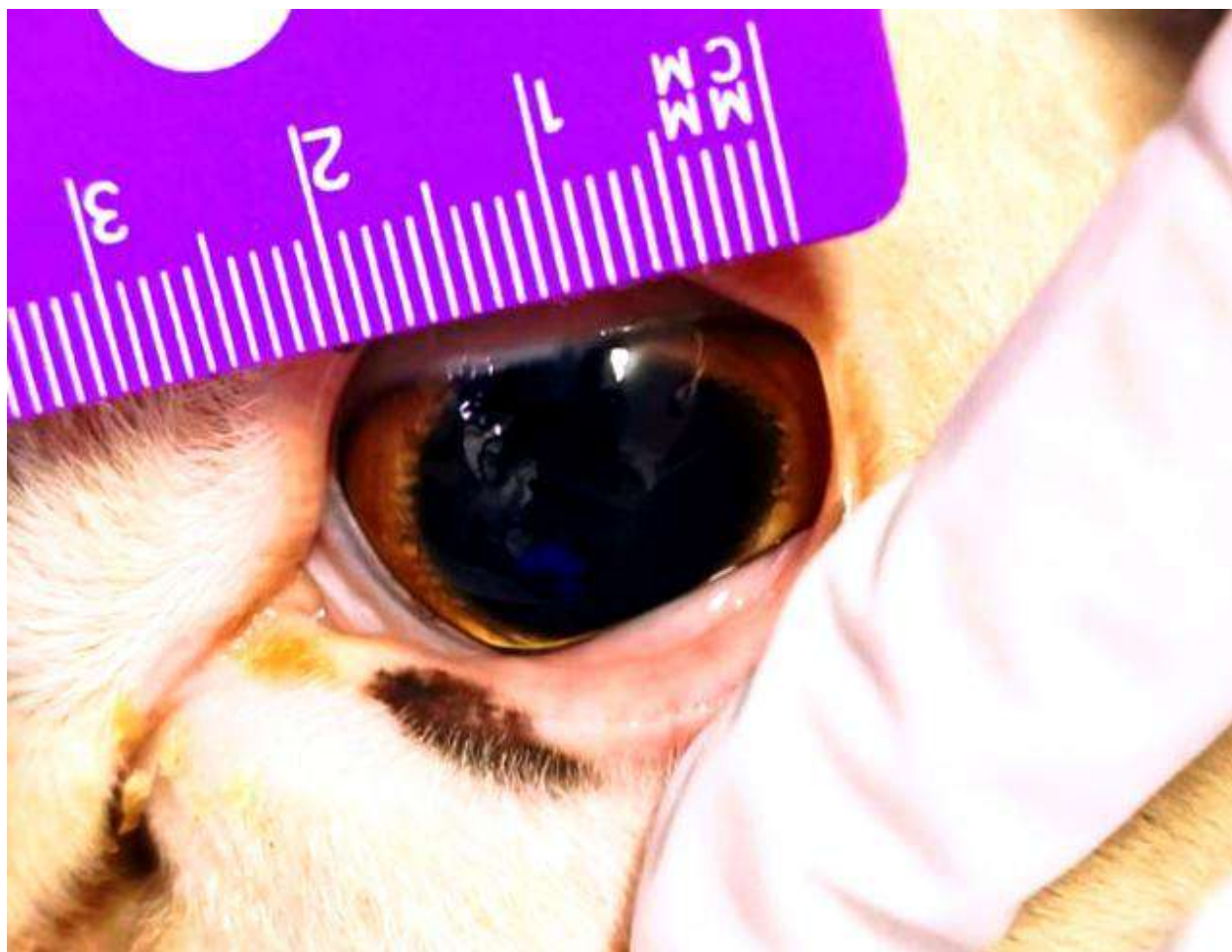


Slika 3. Neinvazivno mjerenje intraokularnog tlaka prijenosnim tonometrom Tono-Pen

Promjer zjenice (PZ) mjerio se u jasno definiranim vremenskim točkama s ciljem analize i praćenja njegovih promjena sukladno povezanosti s intraokularnim tlakom te praćenja neurovegetativnih odgovora tijekom različitih faza anestezije i operacijskog zahvata. Promjer zjenice mjerio se pomoću ravnala s milimetarskom skalom, pri čemu su očitavanja vršena izravno u frontalnoj projekciji oka u stabilnim svjetlosnim uvjetima (Slika 4). Prvo mjerenje provedeno je u bazalnom stanju, 15 minuta nakon primjene premedikacije, čime je definirana početna vrijednost za sve varijable dok su preostala mjerenja provedena u unaprijed standardiziranim vremenskim

intervalima tijekom trajanja opće anestezije i operacijskog zahvata. Vremenske točke odabrane su u skladu s očekivanim farmakodinamičkim učinkom anestetika i analgetika, te odgovara rajućom dubinom anestezije i potencijalnim operacijskim podražajem.

Kontinuirano praćenje promjera zjenice sastavni je dio eksperimentalnog protokola s ciljem osiguranja točnosti i pouzdanosti očitavanja intraokularnog tlaka, ali i boljeg razumijevanja neurofizioloških i farmakoloških odgovora organizma na primijenjene anestetike i analgetike.



Slika 4. Mjerenje promjera zjenice oka ovce linearnim ravnalom

4.7. Uzorkovanje krvi te pretrage krvi i krvnih seruma

U sklopu istraživanja provedena je longitudinalna analiza hematoloških, biokemijskih i stresom induciranih pokazatelja kod ovaca podvrgnutih kirurškom zahvatu. Uzorci krvi uzimani su iz v. *jugularis* u sterilne vakuumske epruvete (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, SAD), epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom za hematološke analize te bez aditiva za dobivanje seruma za biokemijske i imunoanalize. Uzorci namijenjeni serološkim analizama ostavljeni su da se koaguliraju pri sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) tijekom 30 minuta, nakon čega su centrifugirani pri 3000 rpm tijekom 10 minuta (Hettich Universal 320 R, Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka). Dobiveni serumi pažljivo su pipetirani i preneseni u sterilne kriotube te su pohranjeni na -80 °C do trenutka analize. Venska krv uzorkovana je u tri jasno definirane vremenske točke, označene kao 0, 3 i 24, kako bi se omogućilo praćenje dinamičkih promjena u pokazateljima od interesa.

0 – predstavlja prvo vađenje krvi, 15 minuta nakon premedikacije

3- drugo vađenje krvi, 3 sata nakon prvog vađenja krvi

24 – treće vađenje krvi, 24 sata nakon prvog vađenja krvi

4.7.1. Hematološke i biokemijske analize krvi

Kompletna krvna slika određena je unutar dva sata od vađenja krvi pomoću automatskog hematološkog analizatora (Horiba Medical, Scil Vet abc Plus, Scil Antech Diagnostics, Viernheim, Njemačka). Sve analize su rađene s reagensima istog proizvođača. Pokazatelji su uključivali broj eritrocita, srednji volumen eritrocita (MCV), koncentraciju hemoglobina, hematokrit, prosječnu masu hemoglobina po crvenom krvnom zrcu (MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina u jednoj litri eritrocita (MCHC), raspodjelu eritrocita po obujmu (RDW), broj leukocita i trombocita, prosječni obujam trombocita (MPV), diferencijalnu leukocitnu sliku, limfocite, eozinofile.

Biokemijski pokazatelji analizirani su korištenjem automatskog biokemijskog analizatora (Abbott Architect c4000, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, SAD) uz standardiziranu upotrebu reagensa iz iste proizvodne linije. U svakom serumu određene su koncentracije sljedećih pokazatelja: albumini, ukupni proteini, alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST), urea, kreatinin, alkalna fosfataza (AP), glukoza i ukupni bilirubin. Svi pokazatelji određeni su pomoću originalnih reagensa prema uputama proizvođača.

4.7.2. Određivanje bioloških pokazatelja stresa

Za kvantifikaciju koncentracija kopeptina i kortizola korišten je komercijalno dostupan enzimski imunosorpcijski test (ELISA). Za kopeptin korišten je ELISA kit Sheep Vasopressin-neurophysin 2-copeptin (AVP) ELISA kit (Biomatik, Biocat, Njemačka) dok je za kortizol korišten kompetitivni kolorimetrijski Sheep Cortisol ELISA Kit (Biomatik, Biocat, Njemačka). Sve analize napravljene su prema protokolu proizvođača. Apsorbancije su očitane na mikrotiterskom čitaču (Infinite® 200 PRO, Tecan Austria GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 450 nm, a koncentracije su izračunate temeljem standardne krivulje za svaki analit.

Koncentracija haptoglobina određena je metodom koju su prethodno opisali Eckersall i suradnici (1999.), a koja se temelji na peroksidativnoj aktivnost kompleksa haptoglobin-hemoglobin sa SAT3 (Dojindo, Japan) kao kromogenom pri kiselom pH. Metoda za određivanje koncentracije haptoglobina koristi tri reagensa. Prvi reagens sadrži 30 g/L hemoglobina koji je pripremljen korištenjem ispranih i lizirani goveđih eritrocita. Drugi reagens sadrži 60 mM otopinu

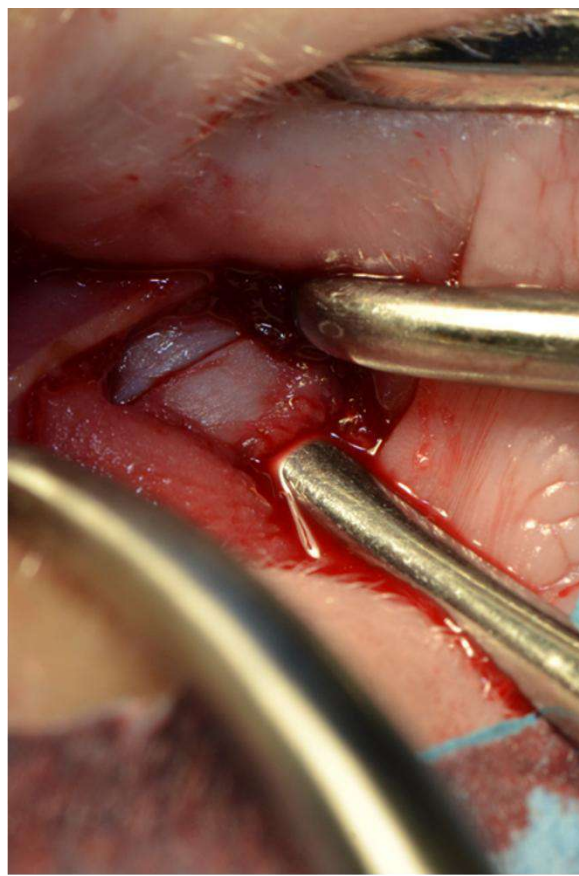
citratne kiseline, 100 mM otopinu Na-hidrogenfosfata (Na_2HPO_4), 1% otopinu detergenta Tween 20, 20 mM otopinu fenola 3,6 mM otopinu L-cistina te 0,32 mM otopinu SAT3 u citratnom puferu pH 3,8. Treći reagens je pripremljen dodatkom 100 μL 30% vodikovog peroksida (H_2O_2) u 25 mL destilirane vode. Sve kemikalije korištene u ovoj metodi nabavljene su od tvrtke Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, SAD). Kalibracijska krivulja haptoglobina pripremljena je s goveđim serumom poznate koncentracije haptoglobina. Analize su provedene na automatskom biokemijskom analizatoru Abbott Architect c4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, SAD).

4.8. Operacijski zahvati

4.8.1. Biopsija hrskavice nosnog septuma

U svih jedinki, neovisno o eksperimentalnoj skupini, provedena je biopsija hrskavice nosne pregrade. Prije zahvata, koža i sluznica oko obje nosnice temeljito su očišćene i antiseptički obrađene 0,1% otopinom povidon-jodida (Betadine®, Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija). Rostralni rub nosne pregrade identificiran je palpacijom, a mjesto incizije definirano je približno 5 mm kaudalno od tog ruba. Napravljen je vertikalni hemitransfiksijski rez kroz rostralni dio nosnog mukoznog epitela (Slika 5).

Mukoza i submukoza pažljivo su odvojene od hrskavice periostalnim elevatorom, nakon čega je uz pomoć sterilnog jednokratnog cilindričnog noža za ubodnu biopsiju promjera 8 mm uzet ciljani uzorak hrskavice pune debljine nosne pregrade. Nakon eksplantacije, sluznica je rekonstruirana šivanjem u jednom sloju resorptivnom multifilamentnom niti pojedinačnim čvorastim šavovima (Polysorb™ 3-0, Covidien, SAD).



Slika 5. Biopsija hrskavice nosnog septuma

Bioprirano podruće dodatno je isprano sterilnom Ringerovom otopinom kako bi se uklonile krv i ostaci tkiva. Hrkavica je višestruko isprana fiziološkom otopinom, osušena sterilnom kompresom i spremljena u sterilni transportni medij (kompletni medij s 10 % fetalnog goveđeg seruma, FBS) na +4 °C. Transportni medij sadržavao je sljedeće komponente: 87 % (v/v) Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) visoke glukoze (D5671, Sigma-Aldrich, SAD), 10 % (v/v), fetalni goveđi serum (FBS) (10500-064, Gibco, SAD), 1 % (v/v), penicilin-streptomycin-glutamin (PSG; 10378-016, Gibco, SAD), 1 % (v/v) HEPES pufer (15630-056, Invitrogen, SAD) i 1 % (v/v) natrijev piruvat (S8636, Sigma-Aldrich, SAD).

Dobiveni uzorci potom su transportirani u laboratorije Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi daljnje analize i obrade.

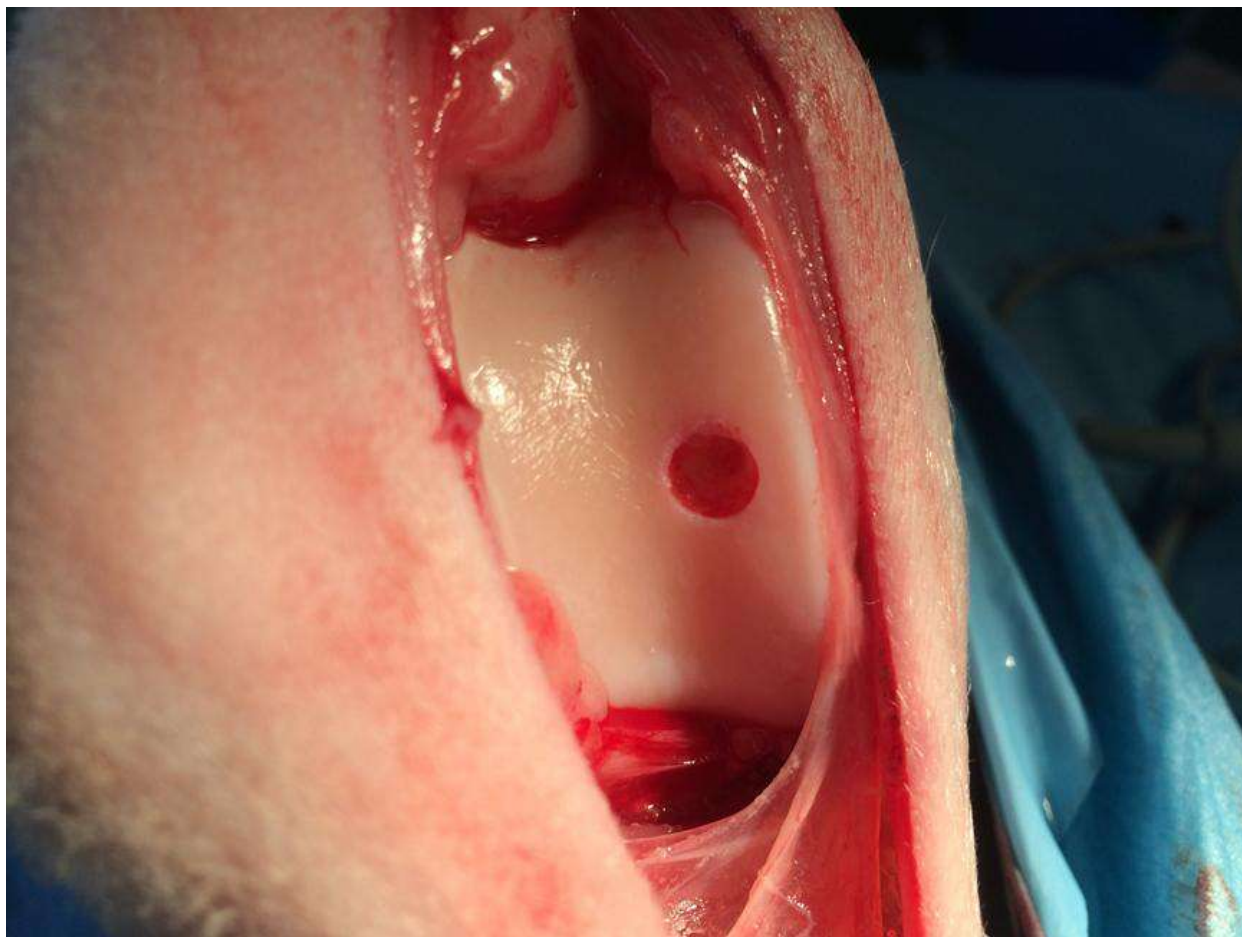
4.8.2. Ugradnja tkivnih presadaka

Kod svih jedinki operacija je izvedena na desnom koljenom zglobu, unutarnjim parapatelarnim pristup. Rez na koži započinjao je iznad koštane izbočine na goljeničnoj kosti (lat. *Tuberositas tibiae*), s unutrašnje strane od patelarnog ligamenta te uzduž prateći kranijalni prednji rub bedrene kosti. Artrotomski rez slijedio je istu liniju kao i rez na koži. Distalni rez unutrašnje fascije prvo je načinjen skalpelom, započinjući nasuprot distalnog pola čašice i nekoliko milimetara prema unutrašnjem dijelu od ligamenta čašice. Na proksimalnom kraju reza načinjen je punktiiformni rez u zglob te je potom rezana zglobna kapsula, unutrašnja parapatelarna fibrohrskavica, unutrašnja fascija, unutanji široki mišić bedra (*vastus medialis*) i prednji dio krojačkog mišića (*musculus sartorius*). Čašica je luksirana prema vanjskom dijelu bedrene kosti radi bolje vizualizacije zgloba, a potom rotirana kako bi zglobna površina bila u potpunosti izložena. Na njoj je napravljeno oštećenje u skladu s oštećenjem na žlijebu bedrene kosti. Oštećenja pune debljine hrskavice, promjera 6 mm, izrađeni su na zglobnim površinama žlijeba bedrene kosti i čašice korištenjem kirurškog borskog svrdla (Slika 6).



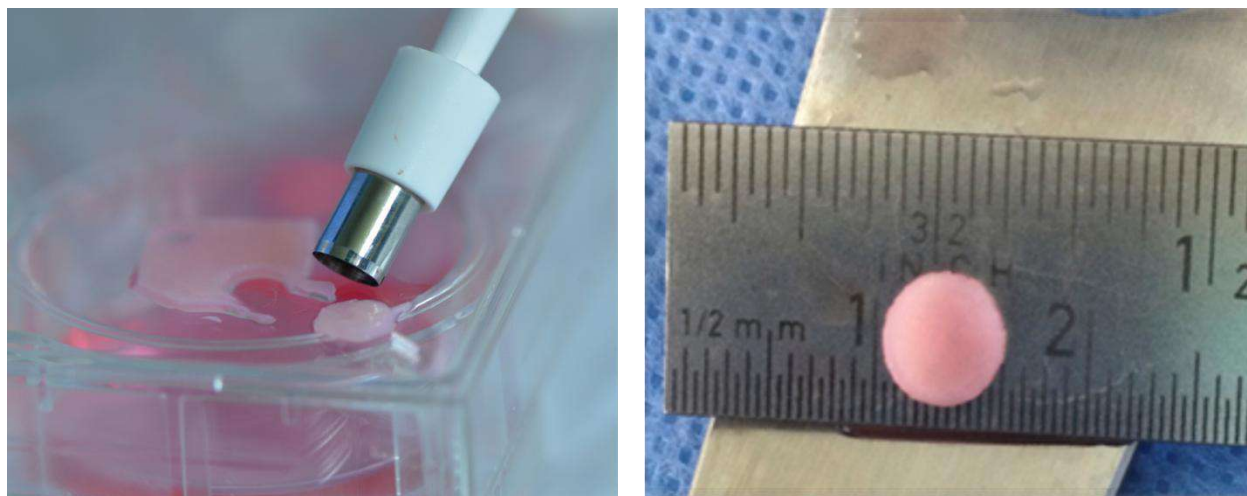
Slika 6. Izrada oštećenja pomoću svrdla, vodilice za bušenje i graničnika dubine.

Rubovi oštećenja zaglađeni su pomoću cilindričnog noža za ubodnu biopsiju promjera 6 mm (Slika 7). Zglob je potom ispiran sterilnom fiziološkom otopinom.



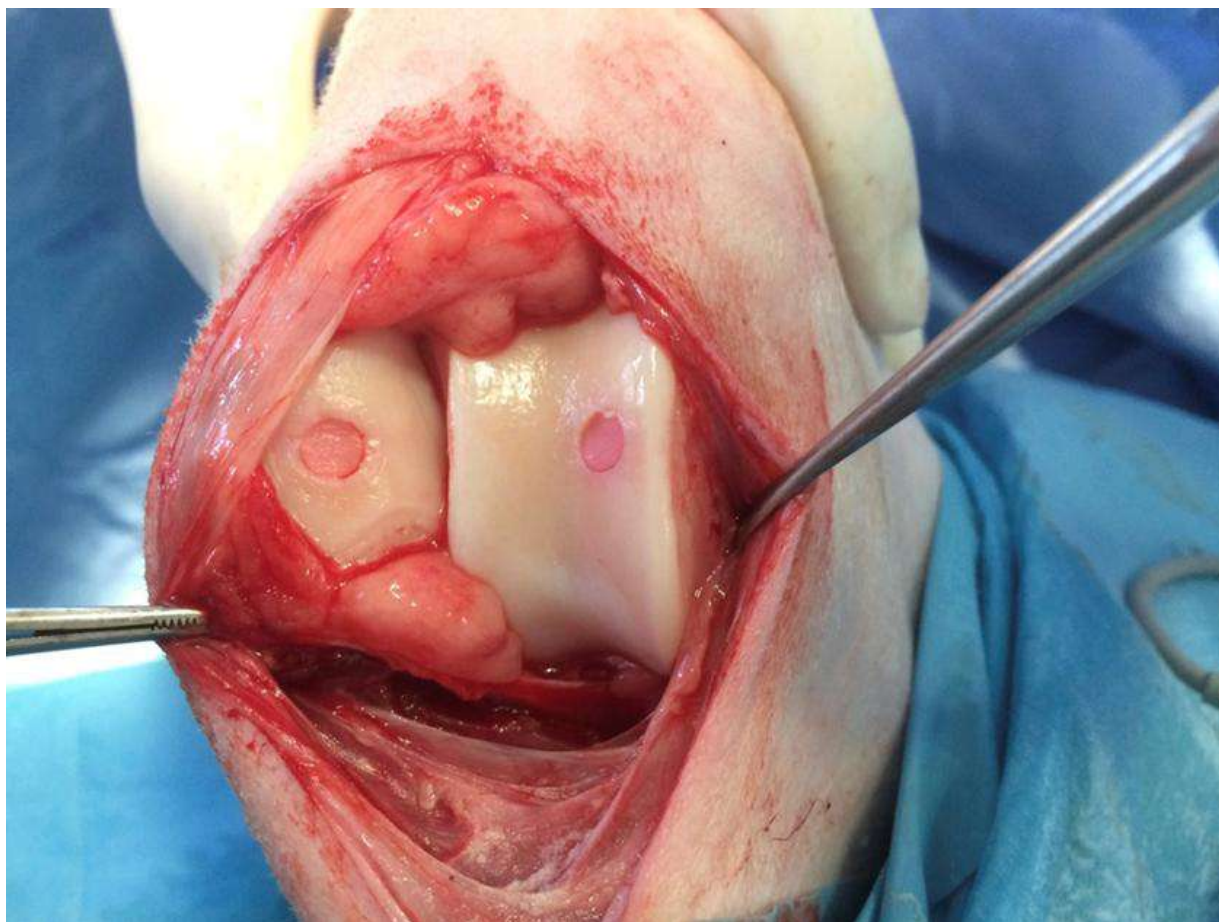
Slika 7. Formirano oštećenje na unutarnjem dijelu žlijeba bedrene kosti

Presadci su prilagođeni na odgovarajuću veličinu korištenjem cilindričnog noža za ubodnu biopsiju te su ugrađeni u oštećenja (Slika 9.)



Slika 9. Priprema presadka za ugradnju

U kontrolnoj skupini (n=10) ugrađen je samo nosač, u eksperimentalnoj skupini 1(n=10) ugrađen je presadak s nosačem koji sadrži stanice nazalnih hondrocita po N-TEC protokolu dok je u eksperimentalnoj skupini 2 (n=10) ugrađen presadak s nosačem koji sadrži stanice nazalnih hondrocita po N-CAM protokolu. Kod svih ovaca učvršćivanje presadaka ostvareno je tehnikom utisnog uklapanja (eng. *press-fit*) bez dodatnog učvršćivanja. Nakon izvođenja 30 pasivnih pokreta savijanja i ispružanja noge kroz puni opseg pokreta koljena, procijenjena je stabilnost ugrađenog presadka, odnosno nosača (Slika 10). Rekonstrukcija tkiva provedena je slojevito, prema anatomskim strukturama.



Slika 10. Ugrađeni presadci u prethodno napravljena oštećenja zglobove hrskavice žlijeba bedrene kosti i čašice

4.8.3. Eutanazija i eksplantacija

Nakon šest tjedana od ugradnje presadaka žrtvovano je po pet ovaca iz svake skupine (prva vremenska točka). Preostale životinje žrtvovane su nakon 6 mjeseci (druga vremenska točka). Ovce su, u skladu s dozvolom, žrtvovane pripremljenom registriranim za eutanaziju životinja, letalnom injekcijom T61 (mješavina embutramida, mebezonijskog jodida i tetrakaina klorida; Intervet International GmbH, Unterschleißheim, Njemačka) uz prethodnu sedaciju prema navedenom anesteziološkom protokolu. Usmrćivanje je potvrđeno trajnim prestankom cirkulacije uz praćenje EKG-a. Istim pristupom kao i za operacije, pristupilo se eksplantaciji desnog koljena (Slika 11). Oscilacijskom pilom odvojen je žlijeb bedrene kosti i čašica. Uzeti su koštano-hrskavični blokovi veličine 10x10x5 mm koji uključuje mjesto oštećenja i okolnu zdravu hrskavicu za potrebe daljnje

analize (Slika 12.). Žlijeb bedrene kosti i čašica uzete su i s lijevog, neoperiranog koljena. Blokovi su odmah uronjeni u 4 % puferirani paraformaldehid. Osteohondralni blokovi tkiva, koji obuhvaćaju tretirana oštećenja i okolno tkivo, analizirani su makroskopskim pregledom, magnetskom rezonancom, mikrokompjuterskom tomografijom, histologijom, imunohistohemijom i biohemijskim metodama.



Slika 11. Oštećenja i presadci na žlijebu bedrene kosti i čašice



Slika 12. Osteohondralni blok za daljnju analizu tkiva

4.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada uključivala je usporedbu svih podataka dobivenih iz anestezioloških protokola, uz dodatno ispitivanje povezanosti koncentracija kopeptina, kortizola i haptoglobina s odabranim hematološkim i biokemijskim pokazateljima. U okviru deskriptivne statistike provedena je analiza centralne tendencije (aritmetička sredina i medijan) te varijabilnosti podataka (standardna devijacija, interkvartilni i ukupni raspon). Za procjenu distribucije podataka korišten je Shapiro–Wilkov test.

Na temelju rezultata testa normalnosti, daljnje usporedbe između skupina provedene su odgovarajućim metodama: u slučaju normalne distribucije primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), a za podatke koji ne prate normalnu distribuciju korišten je Kruskal–Wallisov test. Kod usporedbe podataka kroz vrijeme (ponovljena mjerenja) korištena je ANOVA za ponovljene mjere, uz primjenu Bonferronijeve korekcije radi kontrole alfa pogreške u

višestrukim usporedbama. Za post-hoc analize između skupina primijenjeni su Tukeyev test i Dunnettov test. Povezanost među varijablama dodatno je procijenjena Spearmanovim testom korelacije rangova.

Statistički značajnom smatrana je razlika za vrijednosti $p < 0,05$. Sve analize napravljene su u računalnom programu RStudio v.2025.05.0 build 496 kao integriranom radnom okružju (<https://posit.co/>) za R programski jezik v.4.5.1 (R Core Team (2025). R: jezik i okruženje za statističko računanje. R Foundation for Statistical Computing, Austrija, <https://www.R-project.org/>).

5. REZULTATI

Sve jedinice sudjelovale su u svim fazama pokusa, pri čemu nijedna životinja nije bila isključena iz istraživanja. Iz svake skupine isključena su po dva uzorka smrznutih seruma za analizu vrijednosti kopeptina, kortizola i haptoglobina zbog oštećenja nastalog tijekom odmrzavanja iz -80°C , što je rezultiralo nepouzdanim rezultatima za te uzorke. Tijekom poslijeoperacijskog razdoblja kod nijedne životinje nisu zabilježene komplikacije povezane s anestezijom ili operacijskim zahvatom.

5.1. Analiza bioloških pokazatelja akutnog stresnog odgovora u serumu ovaca

5.1.1. Analiza serumske vrijednosti kopeptina u perioperacijskom razdoblju

Analiza vrijednosti kopeptina unutar skupina tijekom tri vremenske točke nije pokazala statistički značajne promjene, kao što nisu utvrđene ni razlike između skupina. Ipak, zabilježena je veća varijabilnost u prvoj i trećoj skupini (Tablica 2.), dok je druga skupina pokazala najmanju raspršenost rezultata. U prvoj i drugoj skupini uočen je porast vrijednosti kopeptina u trećoj vremenskoj točki u odnosu na prethodne, dok je u trećoj skupini u drugoj i trećoj vremenskoj točki zabilježen pad u usporedbi s početnom vrijednošću. Druga skupina je tijekom svih mjerenja imala najniže vrijednosti kopeptina, no razlike u odnosu na prvu i treću skupinu nisu bile statistički značajne. Izdvojene vrijednosti kopeptina javljaju se nasumično u svim skupinama i vremenskim točkama te su one signifikantne ($p \approx 7.6 \times 10^{-45}$), iako grupni i vremenski efekti nisu uočeni.

Tablica 2. Vrijednosti serumskog kopeptina u ovaca, analizirane u tri vremenske točke i unutar triju skupina

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Medijan (ng/mL)	Raspon (min–max) (ng/mL)
1	0	8	0,703 ± 1,158	0,286	0,139–3,544
	3	8	0,695 ± 1,158	0,248	0,157–3,536
	24	8	0,782 ± 1,133	0,370	0,202–3,544
2	0	8	0,287 ± 0,074	0,325	0,150–0,358
	3	8	0,261 ± 0,074	0,268	0,159–0,350
	24	8	0,312 ± 0,117	0,348	0,151–0,442
3	0	8	0,582 ± 0,832	0,269	0,143–2,605
	3	8	0,575 ± 0,808	0,345	0,128–2,554
	24	8	0,563 ± 0,721	0,338	0,124–2,300

5.1.2. Analiza serumske vrijednosti kortizola u perioperacijskom razdoblju

Analizom vrijednosti kortizola u serumu utvrđene su vrlo niske koncentracije u svim skupinama i u svim vremenskim točkama. U drugoj vremenskoj točki u skupini 1 uočen je širi interkvartilni raspon uz gotovo jednak medijan u odnosu na početnu vrijednost (Tablica 3.). U trećoj vremenskoj točki skupina 1 pokazuje značajno više vrijednosti kortizola u usporedbi s prvom i drugom vremenskom točkama te s ostalim skupinama. Skupina 2 zadržava ujednačene vrijednosti kortizola kroz sve tri vremenske točke, bez većih odstupanja. U skupini 3 u drugoj vremenskoj točki zabilježene su više vrijednosti kortizola u odnosu na početnu, uz širi raspon rezultata, dok su u trećoj vremenskoj točki vrijednosti bile gotovo istovjetne početnim. Nema statistiki značajne razlike unutar i između skupina kroz tri vremenske točke. Statistički je značajna individualna varijabilnost ($p=2.010 \times 10^{-5}$)

Tablica 3. Vrijednosti serumskog kortizola u ovaca, analizirane u tri vremenske točke i unutar triju skupina

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (ng/mL)	Medijan (ng/mL)	Raspon (min–max) (ng/mL)
1	0	8	0,302 ± 0,528	0,114	0,087–1,608
	3	8	0,307 ± 0,575	0,097	0,082–1,728
	24	8	0,328 ± 0,619	0,115	0,076–1,859
2	0	8	0,105 ± 0,019	0,105	0,079–0,140
	3	8	0,107 ± 0,006	0,106	0,099–0,116
	24	8	0,108 ± 0,011	0,108	0,095–0,125
3	0	8	0,109 ± 0,020	0,113	0,079–0,136
	3	8	0,123 ± 0,023	0,121	0,084–0,159
	24	8	0,097 ± 0,020	0,088	0,079–0,126

5.1.3. Analiza serumske vrijednosti haptoglobina u perioperacijskom razdoblju

Analiza serumskih vrijednosti haptoglobina Kruskal-Wallisovim testom pokazala je statistički značajnu razliku među skupinama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) prisutna je između skupine 1 i skupine 3 u vremenskim točkama 0 i 24 te između skupine 2 i skupine 3 u vremenskoj točki 3 (Tablica 4.). Skupina 1 u usporedbi s ostalima zadržava najviše vrijednosti haptoglobina, dok se u vremenskoj točki 24 bilježi porast vrijednosti u drugoj i trećoj skupini u odnosu na prijašnje vremenske točke. U skupini 2 prisutna je statistički značajna razlika između vremenske točke 0 ($0,0436 \pm 0,0386$ g/L) i 24 ($0,0703 \pm 0,0487$ g/L) (Tablica 4a.).

Tablica 4. Vrijednosti serumskog haptoglobina u ovaca, analizirane u tri vremenske točke i unutar triju skupina. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u vremenskoj točki 0 između skupina označena je simbolima (+, *). Statistički značajna razlika u vremenskoj točki 3 između skupina označena je slovima (A, B)

Vremenska točka	Skupina	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (g/L)	Medijan (g/L)	Raspon (min–max) (g/L)
0	1*	8	$0,0824 \pm 0,0365$	0,0790	0,0218–0,1328
	2*+	8	$0,0436 \pm 0,0386$	0,0301	0,0256–0,1387
	3*	8	$0,0248 \pm 0,0171$	0,0206	0,0061–0,0627
3	1A	8	$0,0740 \pm 0,0590$	0,0636	0,0085–0,1737
	2A	8	$0,0505 \pm 0,0210$	0,0462	0,0270–0,0910
	3B	8	$0,0225 \pm 0,0106$	0,0218	0,0066–0,0386
24	1	8	$0,0795 \pm 0,0802$	0,0499	0,0088–0,2263
	2	8	$0,0703 \pm 0,0487$	0,0520	0,0294–0,1484
	3	8	$0,0450 \pm 0,0413$	0,0469	0,0032–0,1347

Tablica 4a. Vrijednosti serumskog haptoglobina u ovaca, analizirane u tri vremenske točke i unutar triju skupina. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) unutar skupine fentanil označena je simbolima (+, *)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (g/L)	Medijan (g/L)	Raspon (min–max) (g/L)
1	0	8	$0,0824 \pm 0,0365$	0,0790	0,0218–0,1328
	3	8	$0,0740 \pm 0,0590$	0,0636	0,0085–0,1737
	24	8	$0,0795 \pm 0,0802$	0,0499	0,0088–0,2263
2	0*	8	$0,0436 \pm 0,0386$	0,0301	0,0256–0,1387
	3*+	8	$0,0505 \pm 0,0210$	0,0462	0,0270–0,0910
	24+	8	$0,0703 \pm 0,0487$	0,0520	0,0294–0,1484
3	0	8	$0,0248 \pm 0,0171$	0,0206	0,0061–0,0627
	3	8	$0,0225 \pm 0,0106$	0,0218	0,0066–0,0386
	24	8	$0,0450 \pm 0,0413$	0,0469	0,0032–0,1347

Povezanost među biološkim pokazateljima stresa procijenjena je Spearmanovim testom korelacije rangova. Serumske vrijednosti kopeptina i kortizola pokazale su vrijednosti korelacije ($\rho = 0,08$), koja nisu bile statistički značajne ($p = 0,53$). Analiza serumskih vrijednosti između kopeptina i haptoglobina pokazala je vrijednosti korelacije ($\rho = 0,093$), koje također nisu bile statistički značajne ($p = 0,478$). Nasuprot tome, analiza serumskih vrijednosti između kortizola i haptoglobina pokazala je vrlo slab negativan odnos ($\rho = -0,019$), koji nije bio statistički značajan ($p = 0,885$) (Slika 13).



Slika 13. Korelogram prikazuje povezanost između vrijednosti haptoglobina, kortizola, kopeptina i albumina. Vrijednosti koeficijenta korelacije prikazane su unutar kvadrata, dok intenzitet boje i veličina kvadrata odražavaju jačinu povezanosti. Plava boja označava pozitivnu, a crvena negativnu korelaciju. Uočen je blagi pozitivni odnos između kortizola i kopeptina, kopeptina i haptoglobina te između kopeptina i albumina, dok je jedina negativna povezanost zabilježena između haptoglobina i albumina.

5.2. Analiza biokemijskih pokazatelja krvi

5.2.1. Analiza vrijednosti serumskog albumina u ovaca u perioperacijskom razdoblju

Analizom među skupinama Kruskal-Wallisovim testom utvrđena je statistički značajna ($p < 0,05$) razlika između skupine 2 i 3 između svih vremenskih točaka pri čemu su vrijednosti albumina bile konzistentno više u skupini 2 u sve tri vremenske točke (0: $p = 0,01$; 3: $p = 0,011$; 24: $p = 0,007$) (Tablica 5.). Unutar skupine 3 očituje se statistički značajna razlika između vremenske točke 0 i 24 (Tablica 5a.). U skupini 1 uočava se raspršenost podataka u vremenskoj točki 24 dok je u skupini 2 i 3 ona vidljiva u vremenskoj točki 3. Skupina 2 zadržava isti medijan kroz sve tri vremenske točke.

Tablica 5. Vrijednosti serumskog albumina u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički je značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina u vremenskoj točki označena slovima (A, B)

Vremenska točka	Skupina	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (g/L)	Medijan (g/L)	Raspon (min–max) (g/L)
0	1 AB	10	$30,9 \pm 2,73$	30,5	26–35
	2 A	10	$28,9 \pm 2,13$	29	25–32
	3 B	10	$31,4 \pm 1,35$	31	30–34
3	2 AB	10	$30,5 \pm 3,03$	30,5	26–37
	2 A	10	$29,3 \pm 3,30$	29	26–35
	3 B	10	$32,7 \pm 2,36$	31,5	30–37
24	1 AB	10	$31,4 \pm 2,99$	30	28–37
	2 A	10	$30,1 \pm 2,51$	29	28–35
	3 A	10	$33,0 \pm 1,63$	32,5	31–35

Tablica 5a. Vrijednosti serumskog albumina u tri vremenske točke unutar tri skupine. Unutar skupine 3 prisutna je statistički značajna razlika označena simbolima (*,+)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost(g/L)	Medijan (g/L)	Raspon (min–max) (g/L)
1	0	10	30,9 ± 2,73	30,5	26–35
	3	10	30,5 ± 3,03	30,5	26–37
	24	10	31,4 ± 2,99	30	28–37
2	0	10	28,9 ± 2,13	29	25–32
	3	10	29,3 ± 3,30	29	26–35
	24	10	30,1 ± 2,51	29	28–35
3	0 *	10	31,4 ± 1,35	31	30–34
	3 *+	10	32,7 ± 2,36	31,5	30–37
	24 +	10	33,0 ± 1,63	32,5	31–35

5.2.2. Analiza serumске vrijednosti enzima alanin-aminotransferaze u perioperacijskom razdoblju

Analizom serumске vrijednosti ALT-a Friedmanovim testom uočena je značajna razlike unutar skupina između vremenskih točaka. Random efekti bili su značajni ($p = 0,001$), što upućuje na varijabilnost između jedinki. U skupini 1 uočava se statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vremenske točke 3 i vremenske točke 24 te između vremenske točke 0 i 24. U skupini 2 statistički je značajna razlika između vremenske točke 0 i vremenske točke 24 dok je skupini 3 također prisutna statistički značajna razlika između skupine 0 i skupine 24 (Tablica 6.).

Tablica 6. Vrijednosti serumskog enzima alanin-aminotransferaze u ovaca u tri vremenske točke unutar tri skupine. Simboli (*,+,#) označavaju statističke značajne promjene ($p<0,05$) u vremenskim točkama unutar skupine.

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (U/L)	Medijan (U/L)	Raspon (min–max) (U/L)
1	0 *	10	$18,9 \pm 3,96$	18,5	15–29
	3 *	10	$20,7 \pm 4,14$	21,0	15–30
	24+	10	$28,4 \pm 4,99$	28,5	22–39
2	0 *	10	$22,1 \pm 2,73$	21,5	19–27
	3 *+	10	$23,6 \pm 3,06$	22,5	20–29
	24 +	10	$27,5 \pm 6,55$	25,5	20–43
3	0 *	10	$18,9 \pm 5,90$	19,0	11–29
	3 +*	10	$22,1 \pm 6,03$	22,0	12–31
	24 +	10	$33,9 \pm 19,30$	29,0	15–86

5.2.3. Analiza serumske vrijednosti enzima alkalne fosfataze u perioperacijskom razdoblju

Analizom serumske vrijednosti AP uočena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina u vremenskim točkama. U Vremeskoj točki 0 prisutna je statistički značajna razlika između skupine 2 i 3 dok je vremenskoj točki 3 prisutna statistički značajna razlika između skupine 1 i 3 te skupine 2 i 3. Unutar skupine 2 statistički je značajna razlika između vremenskih točki 0 i 24 (Tablica 7.). U drugoj vremenskoj točki u svim skupinama bilježi se porast vrijednosti AP dok skupine 1 i 2 u trećoj vremenskoj točki bilježe pad vrijednosti u odnosu na drugu vremensku točku. U svakoj vremenskoj točki uočeno je nekoliko odstupajućih vrijednosti koje značajno odstupaju od medijana.

Tablica 7. Serumske vrijednosti enzima alkalne fosfataze u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički je značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina označena je slovom (A, B) dok je unutar skupine statistički značajna razlika označena simbolom (*,+)

Vremenska točka	Skupina	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (U/L)	Medijan (U/L)	Raspon (min–max) (U/L)
0	1 AB	10	48,7 ± 33,91	37	14–137
	2 A *	10	56,1 ± 45,71	34	28–150
	3 B	10	62,3 ± 14,62	68	34–79
3	1 A	10	54,4 ± 41,15	42	15–163
	2 A	10	72,8 ± 81,72	39	27–282
	3 B	10	69,1 ± 16,77	66	44–102
24	1	10	53,4 ± 21,61	49,5	24–101
	2 +	10	71,4 ± 49,15	48,5	36–175
	3	10	63,7 ± 13,75	58,5	50–90

5.2.4. Analiza serumske vrijednosti enzima aspartat-aminotransferaze u perioperacijskom razdolju

Analizom ponovljenih mjerenja Friedmanovim testom utvrđene su statistički značajne razlike između vremenskih točaka unutar skupine 1, 2 i 3 ($p < 0,05$). U skupini 1 statistički je značajna razlika između vremenske točke 0 i 24 te između vremenske točke 3 i 24 (Tablica 8.). U skupini 2 statistički je značajna razlika između vremenske točke 0 i 24 dok je u skupini 3 također statistički značajna razlika između vremenske točke 0 i 24. U vremenskoj točki 24 uočavaju se povišene vrijednosti medijana u svim skupinama usporedno s početnom točkom. Prisutne su odstupajuće vrijednosti u svim vremenskim točkama.

Tablica 8. Serumske vrijednosti enzima aspartat-aminotransferaze u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika između skupina označena slovima (A, B)

Skupin	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (U/L)	Medijan (U/L)	Raspon (min–max) (U/L)
1	0 A	10	$116,4 \pm 35,0$	104	90–197
	3 A	10	$143,7 \pm 31,44$	145	107–198
	24 B	10	$233,4 \pm 63,56$	221	169–374
2	0 A	10	$110,5 \pm 19,79$	111	76–141
	3 AB	10	$134,7 \pm 28,46$	129,5	81–178
	24 B	10	$186,7 \pm 57,46$	188	111–316
3	0 A	10	$112,5 \pm 22,59$	110,5	74–153
	3 AB	10	$143,2 \pm 28,62$	151	78–170
	24 B	10	$255,6 \pm 139,57$	220,5	125–631

5.2.5. Analiza serumskih vrijednosti bilirubina u perioperacijskom razdoblju

Analizom Kruskal-Wallisovim testom utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između i unutar skupina. U vremenskoj točki 0 značajne razlike zabilježene su između skupina 1 i 3 te između skupina 2 i 3, dok su u vremenskoj točki 3 značajne razlike također prisutne između skupina 1 i 3 te 2 i 3 (Tablica 9.). Unutar skupine 1 uočene su značajne razlike između vremenskih točaka 0 i 3 te između vremenskih točaka 0 i 24, dok je u skupini 2 značajna razlika potvrđena između vremenskih točaka 0 i 24 (Tablica 9a.). U skupinama 1 i 3 zabilježen je porast vrijednosti bilirubina u vremenskim točkama 3 i 24, dok su u skupini 2 vrijednosti medijana bilirubina u vremenskim točkama 3 i 24 ostale gotovo nepromijenjene. U svim vremenskim točkama uočena su pojedinačna odstupanja vrijednosti.

Tablica 9. Vrijednosti serumskog bilirubina u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika između skupina označena je slovima (A i B)

Vremenska točka	Skupina	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost ($\mu\text{mol/L}$)	Medijan ($\mu\text{mol/L}$)	Raspon (min–max) ($\mu\text{mol/L}$)
0	1 A	10	$3,46 \pm 0,62$	3,60	2,3–4,5
	2 A	10	$4,10 \pm 1,10$	4,00	2,6–5,8
	3 B	10	$2,64 \pm 0,76$	2,35	1,9–4,5
3	1 A	10	$4,51 \pm 1,38$	4,05	3,2–8,0
	2 A	10	$4,99 \pm 1,81$	4,35	3,3–8,9
	3 B	10	$3,03 \pm 0,79$	2,75	2,2–4,7
24	1	10	$4,50 \pm 0,72$	4,80	2,8–5,1
	2	10	$4,70 \pm 1,11$	4,45	3,6–6,8
	3	10	$4,01 \pm 0,93$	4,15	1,8–5,4

Tablica 9a. Vrijednosti serumskog bilirubina u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika prisutna je unutar skupine 1 te je označena simbolima (*,+)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost ($\mu\text{mol/L}$)	Medijan ($\mu\text{mol/L}$)	Raspon (min–max) ($\mu\text{mol/L}$)
1	0 *	10	$3,46 \pm 0,62$	3,60	2,3–4,5
	3 +	10	$4,10 \pm 1,10$	4,05	3,2–8,0
	24 +	10	$2,64 \pm 0,76$	4,80	2,8–5,1
2	0	10	$4,51 \pm 1,38$	4,00	2,6–5,8
	3	10	$4,99 \pm 1,81$	4,35	3,3–8,9
	24	10	$3,03 \pm 0,79$	4,45	3,6–6,8
3	0 *	10	$4,50 \pm 0,72$	2,35	1,9–4,5
	3 *+	10	$4,70 \pm 1,11$	2,75	2,2–4,7
	24 +	10	$4,01 \pm 0,93$	4,15	1,8–5,4

5.2.6. Analiza serumskih vrijednosti glukoze u perioperacijskom razdoblju

Analizom Friedmanovim testom utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) unutar skupina između vremenskih točaka. U skupini 1 značajne razlike zabilježene su između vremenskih točaka 0 i 3, 3 i 24 te 0 i 24 (Tablica 10.). U skupini 2 također su potvrđene značajne razlike između vremenskih točaka 0 i 3, 3 i 24 te 0 i 24. Skupina 3 pokazala je značajne razlike između vremenskih točaka 0 i 24 te 3 i 24. U vremenskoj točki 3 uočeno je povišenje medijana u svim skupinama, pri čemu je u skupini 3 zabilježen i značajno širi interkvartilni raspon. U vremenskoj točki 24 u svim skupinama prisutan je pad vrijednosti glukoze uz uže interkvartilne raspone.

Tablica 10. Serumske vrijednosti glukoze u tri vremenske točke unutar tri skupine. Simboli (*,+,#) označavaju statistički značajne razlike unutar skupina između vremenskih točaka

Analgetik	Vrijeme (h)	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (mmol/L)	Medijan (mmol/L)	Raspon (min–max) (mmol/L)
1	0*	10	5,55 ± 1,64	5,50	3,2–8,9
	3+	10	7,48 ± 1,49	7,15	4,8–10,4
	24#	10	3,55 ± 0,58	3,80	2,3–4,1
2	0*	10	5,87 ± 2,37	5,35	3,6–11,6
	3+	10	8,09 ± 1,21	8,05	6,6–11,0
	24#	10	3,90 ± 0,48	3,85	2,9–4,6
3	0*	10	6,21 ± 1,60	6,15	4,2–9,0
	3*	10	7,44 ± 1,95	7,55	4,8–10,1
	24+	10	4,17 ± 0,50	4,00	3,6–5,2

5.2.8. Analiza serumskih vrijednosti ukupnih proteina u perioperacijskom razdoblju

Analizom ukupnih serumskih proteina Kruskal-Wallis testom utvrđene su statistički značajne razlike između skupina dok Friedmanovim testom nije utvrđena značajna razlika između vremenskih točaka unutar skupina. Multivarijatan model potvrdio je značajan učinak skupine te interakcije skupina $\times$ vrijeme, što upućuje na to da se obrasci promjena proteina razlikuju ovisno o primijenjenom analgetiku. U prvoj vremenskoj točki skupina 3 imala je značajno više vrijednosti proteina u usporedbi sa skupinom 2 ($p = 0,0016$) (Tablica 11.). U drugoj vremenskoj točki vrijednosti proteina bile su značajno više u skupini 1 u odnosu na skupinu 2 ($p = 0,002$) te skupinu 3 ($p = 0,047$). U 3 vremenskoj točki skupina 1 je pokazala značajno više vrijednosti u odnosu na skupinu 2 ($p = 0,006$).

Tablica 11. Vrijednosti ukupnih proteina u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) unutar skupina označene su simbolima (*,+)

Vremenska točka	Skupina	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (g/L)	Medijan(g/L)	Min-Max (g/L)
0	1	10 *+	$68.4 \pm 4,695$	4.695	60–76
	2	10 *	$72.4 \pm 2,836$	2.836	68–77
	3	10 +	66.3 ± 4.398	4.398	60–76
3	1	10 *	$64.5 \pm 4,927$	4.927	59–77
	2	10 +	$72.3 \pm 6,447$	6.447	59–78
	3	10 +	68.4 ± 3.864	3.864	63–77
24	1	10 *	$68.1 \pm 4,581$	4.581	60–75
	2	10 +	$73.7 \pm 4,572$	4.572	66–81
	3	10 +*	$71.6 \pm 2,319$	2.319	69–75

5.3. Promjene hematoloških parametara tijekom perioperacijskog razdoblja

5.3.1. Hematološka analiza broja eritrocita

Analiza broja eritrocita ANOVA testom pokazala je da se broj eritrocita značajno mijenjao kroz vrijeme tijekom operacijskog zahvata. Uočava se statistički uznačajna razlika između skupine 1 skupine 3 u drugoj vremenskoj točki ($p = 0,048$) (Tablica 13). Multivarijatna analiza potvrdila je da je vrijeme glavni faktor promjene broja eritrocita, dok interakcija između grupe i vremena nije bila značajna.

Tablica 13. Vrijednosti broja eritrocita u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina označena je slovima (A, B)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost ($\times 10^{12}/L$)	Medijan ($\times 10^{12}/L$)	Min–Max ($\times 10^{12}/L$)
1	0	10	$7,02 \pm 1,46$	7,20	4,9–9,1
	3 A	10	$7,95 \pm 1,21$	7,65	6,3–10,1
	24	10	$9,08 \pm 1,31$	8,60	7,9–11,5
2	0	10	$7,87 \pm 0,74$	7,75	6,8–9,1
	3	10	$8,16 \pm 0,79$	8,15	7,1–9,5
	24	10	$9,41 \pm 0,75$	9,40	8,3–10,8
3	0	10	$7,75 \pm 1,15$	7,20	6,4–9,8
	3 B	10	$8,98 \pm 1,05$	8,75	7,8–11,2
	24	10	$9,55 \pm 1,13$	9,15	8,0–12,0

5.3.2. Promjene vrijednosti hematokrita tijekom perioperacijskog razdoblja

Univarijatnom analizom ANOVA testom vrijednosti hematokrita kroz vrijeme pokazuje da hematokrit značajno varira ($p \approx 9 \times 10^{-12}$) tijekom perioperacijskog perioda, neovisno o grupi. Analizom između grupa uočava se statistički značajna razlika u drugoj vremenskoj točki između skupine 1 i skupine 3 ($p = 0,045$) te između skupine 2 i skupine 3 ($p = 0,048$) (Tablica 14.). Uočava se tendencija porasta vrijednosti hematokrita kroz sve vremenske točke u svim skupinama. Statistički je značajna individualna varijabilnost među životinjama ($p \approx 1 \times 10^{-6}$).

Tablica 14. Vrijednosti hematokrita u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina označena je slovima (A,B)

Skupina	Vremenske točke	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (%)	Medijan (%)	Min–Max (%)
1	0	10	$22,9 \pm 5,34$	23,0	14–30
	3 A	10	$25,1 \pm 4,48$	24,5	18–32
	24	10	$29,0 \pm 4,59$	28,0	25–37
2	0	10	$23,8 \pm 2,62$	23,0	20–28
	3 A	10	$25,5 \pm 2,59$	25,0	22–30
	24	10	$28,6 \pm 2,55$	28,5	25–33
3	0	10	$24,4 \pm 3,86$	23,0	20–32
	3 B	10	$28,7 \pm 3,53$	28,5	24–36
	24	10	$31,5 \pm 3,50$	29,5	28–37

5.3.3. Analiza koncentracije leukocita u perioperativnom periodu

Analiza koncentracije leukocita Kruskal-Wallis testom pokazala je statistički značajnu razliku u trećoj vremenskoj točki između skupine 1 i 2 ($p = 0.021$) te između skupine 2 i 3 ($p = 0.023$) (Tablica 12.). Promjene kroz vrijeme unutar istih skupina analizirane su Friedman testom, koji je pokazao vrlo značajan učinak vremena na broj leukocita ($p < 0.001$). Multivarijatna analiza pokazala je da interakcija skupina i vremena nije značajna ($p = 0.246$), dok je vrijeme samostalno ostalo snažan prediktor promjena leukocita ($p < 0.001$). Statistički su značajne individualne odstupajuće vrijednosti ($p \approx 1,87 \times 10^{-5}$).

Tablica 12. Vrijednosti koncentracije leukocita u tri vremenske točke unutar tri skupine. Statistički značajna razlika između skupina označena je slovima (A, B)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost ($\times 10^9/L$)	Medijan ($\times 10^9/L$)	Raspon (min–max ($\times 10^9/L$))
1	0	10	$4,76 \pm 1,29$	4,65	2,4–7,3
	3	10	$5,17 \pm 1,33$	5,60	3,2–6,7
	24 A	10	$6,20 \pm 1,42$	6,35	3,6–7,8
2	0	10	$5,18 \pm 2,11$	5,75	0,5–8,3
	3	10	$6,55 \pm 2,37$	5,95	3,7–11,0
	24 B	10	$8,28 \pm 2,13$	7,60	5,8–12,8
3	0	10	$4,56 \pm 1,08$	5,00	2,4–5,8
	3	10	$5,22 \pm 1,15$	5,15	3,2–7,3
	24 A	10	$6,37 \pm 1,20$	6,55	3,6–7,8

5.4. Analiza hemodinamskih pokazatelja tijeka anestezije

Tijekom trajanja opće anestezije praćeni su hemodinamski pokazatelji u unaprijed definiranim vremenskim točkama.

5.4.1. Analiza frekvencije disanja nakon primjene analgetika

Deskriptivna analiza respiracijske frekvencije pokazala je da je skupina 1 imala najniže vrijednosti u svim vremenskim točkama (medijan 15–18 udaha/min), dok je skupina 3 imala najviše vrijednosti (medijan 19–22 udaha/min). Skupina 2 zauzimala je srednje vrijednosti (medijan 17–20 udaha/min), uz izraženiju varijabilnost u odnosu na ostale skupine. Univarijatna analiza Kruskal – Wallis testom potvrdila je postojanje značajnih razlika između skupina ($p = 7,05 \times 10^{-8}$). Statistički su značajne razlike između skupine 1 i 3 u vremenskim točkama od 20., 40., 45., 60. i 70. minute ($p < 0,05$) (Tablica 13.). U ostalim usporedbama među skupinama nije bilo značajnih razlika ($p > 0,05$). Odstupajuće vrijednosti individualnih jedinki pokazuju izrazitu značajnost ($p = 6,84 \times 10^{-32}$).

Tablica 13. Vrijednosti frekvencije disanja u šest vremenskih točaka unutar tri skupine tijekom opće anestezije. Statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$) između skupina u vremenskim točkama prikazane su slovima (A, B, C, D, E)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Srednja vrijednost (udaha/min)	Medijan (udaha/min)	Min-Max (udaha/min)
1	15	10	$16,9 \pm 3,84$	18,0	8–22
	20	10 A	$16,2 \pm 5,27$	17,0	6–26
	40	10 B	$16,1 \pm 5,74$	16,5	6–28
	45	10 C	$16,2 \pm 5,49$	16,0	7–28
	60	10 D	$16,4 \pm 4,77$	16,5	8–26
	70	10 E	$14,9 \pm 5,80$	15,5	6–26
2	15	10	$17,0 \pm 2,75$	17,0	13–22
	20	10	$18,2 \pm 2,74$	19,0	14–22
	40	10	$20,2 \pm 4,71$	19,5	14–29
	45	10	$20,3 \pm 6,18$	19,0	12–29
	60	10	$19,7 \pm 6,77$	18,5	10–30
	70	10	$20,1 \pm 7,39$	17,5	12–31
3	15	10	$19,4 \pm 3,37$	19,0	14–25
	20	10 E	$19,9 \pm 2,96$	20,0	14–25
	40	10 D	$21,2 \pm 4,64$	20,0	16–30
	45	10 C	$21,6 \pm 3,34$	21,0	16–28
	60	10 B	$21,4 \pm 4,06$	20,0	17–30
	70	10 A	$21,7 \pm 3,65$	20,0	18–30

5.4.2. Analiza frekvencije rada srca u perioperacijskom razdoblju

Univarijatna analiza pokazala je visoko značajne razlike između skupina ($p = 4.11 \times 10^{-10}$), dok učinak vremena sam po sebi nije bio značajan ($p = 0.547$). Međutim, u multivarijatnom modelu značajna interakcija između grupe i vremena ($p = 0.008$) te značajan učinak vremena ($p = 3.43 \times 10^{-5}$). Post hoc analiza pokazala je da su najveće razlike zabilježene između skupine 2 i skupina 1 i 3 od 40. do 70. minute (Tablica 14.), pri čemu su vrijednosti srčane frekvencije bile značajno niže u skupini 1 ($p < 0.05 - p < 0.01$). Ove razlike nisu bile prisutne u ranijim vremenskim točkama (15. i 20. minuta). Skupina 1 i skupina 3 pokazale su slične vrijednosti srčane frekvencije bez statistički značajnih razlika tijekom cijelog promatranog razdoblja. Statistički je značajna odstupajuća vrijednost ($p = 1.83 \times 10^{-31}$).

Tablica 14. Vrijednosti frekvencije rada srca u šest vremenskih točkaka unutar tri skupine. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina u vremenskim točkama označena je slovima (A, B, C, D)

Skupina	Vrijeme (min)	N	Srednja vrijednost (otk/min)	Medijan (otk/min)	Min–Max (otk/min)
1	15	10	$71,8 \pm 5,29$	72	66–80
	20	10	$72,1 \pm 4,25$	72,5	66–78
	40 B	10	$72,3 \pm 7,80$	70	63–85
	45 A	10	$68,0 \pm 8,37$	67	58–83
	60 D	10	$67,1 \pm 8,35$	66	55–82
	70 C	10	$66,9 \pm 7,34$	67	58–80
2	15	10	$79,6 \pm 13,62$	77	62–100
	20	10	$80,8 \pm 15,15$	79	58–106
	40 A	10	$89,9 \pm 18,06$	85	64–125
	45 B	10	$95,5 \pm 20,22$	90	66–128
	60 C	10	$91,8 \pm 17,97$	93	55–112
	70 D	10	$85,1 \pm 13,63$	86	56–109
3	15	10	$68,7 \pm 21,06$	66	40–108
	20	10	$69,6 \pm 18,99$	68	44–106
	40 B	10	$71,6 \pm 22,76$	65	50–115
	45 A	10	$72,0 \pm 18,90$	65,5	52–115
	60 D	10	$69,4 \pm 16,37$	62,5	55–104
	70 C	10	$65,8 \pm 19,73$	62	32–104

5.4.3. Analiza invazivno i neinvazivno mjerenog arterijskog sistoličkog krvnog tlaka

Univarijatna analiza pokazala je značajne razlike između skupina za oba načina mjerenja arterijskog tlaka — invazivnog ($p = 2.10 \times 10^{-9}$) i neinvazivnog ($p = 5.06 \times 10^{-7}$), kao i izražen utjecaj vremena (iSAT $p = 1.60 \times 10^{-11}$; niSAT $p = 8.13 \times 10^{-11}$). Multivarijatni modeli potvrdili su značajan učinak skupine (iSAT $p = 0.00032$; niSAT $p = 0.0077$) i vremena (iSAT $p = 1.33 \times 10^{-11}$; niSAT $p = 2.00 \times 10^{-10}$), dok interakcija skupina $\times$ vrijeme nije bila značajna u oba modela. To upućuje na stabilne razlike među analgeticima kroz cijelo razdoblje mjerenja. Usporedba pojedinačnih skupina pokazala je dosljedno više vrijednosti tlaka kod levobupivakaina u odnosu na fentanil tijekom gotovo svih vremenskih točaka, i u invazivnom i u neinvazivnom mjerenju ($p < 0.05$ – 0.001). Razlike između fentanila i metadona nisu bile značajne, dok je levobupivakain pokazivao više vrijednosti tlaka u odnosu na metadon u kasnijim vremenskim točkama, 60. i 70. minuta, $p < 0.05$ (Tablica 15.). Statistički značajne odstupajuće vrijednosti u oba modela (iSAT $p = 1.14 \times 10^{-27}$; niSAT $p = 7.05 \times 10^{-24}$) potvrđuje da je dio varijabilnosti rezultat individualnih razlika između životinja.

Tablica 15. Vrijednosti invazivno i neinvazivno mjerenog arterijskog sistoličkog krvnog tlaka u šest vremenskim točkama unutar tri skupine. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina u vremenskim točkama označena je slovima (A, B, C, D)

Skupina	Vremenske točke	Broj životinja (n)	iSAT (mmHg) – srednja vrijednost	niSAT (mmHg) – srednja vrijednost
1	20	10	$82,5 \pm 10,86$	$88,8 \pm 10,61$
	40	10	$83,0 \pm 11,45$ B	$90,8 \pm 11,34$
	45	10	$86,3 \pm 14,15$ C	$94,4 \pm 8,13$
	60	10	$89,4 \pm 16,55$ A	$96,7 \pm 12,64$
	70	10	$88,8 \pm 13,98$ D	$97,2 \pm 12,33$ C
2	20	10	$74,0 \pm 10,33$ A	$79,6 \pm 17,09$ A
	40	10	$75,4 \pm 11,02$ B	$81,0 \pm 17,31$ B
	45	10	$83,5 \pm 14,34$ C	$87,9 \pm 21,32$ C
	60	10	$88,5 \pm 14,04$	$91,6 \pm 20,14$ D
	70	10	$92,7 \pm 11,16$ D	$100,9 \pm 13,42$ E
3	20	10	$99,7 \pm 11,28$ B	$97,7 \pm 10,25$ C
	40	10	$100,6 \pm 12,74$ A	$103,1 \pm 9,70$ A
	45	10	$104,4 \pm 12,69$ D	$103,9 \pm 10,62$ B
	60	10	$109,8 \pm 19,56$ C	$112,8 \pm 13,94$ E
	70	10	$111,8 \pm 17,22$ E	$113,8 \pm 11,55$ D

5.4.4. Analiza neinvazivno i invazivno mjerenog dijastoličkog arterijskog krvnog tlaka

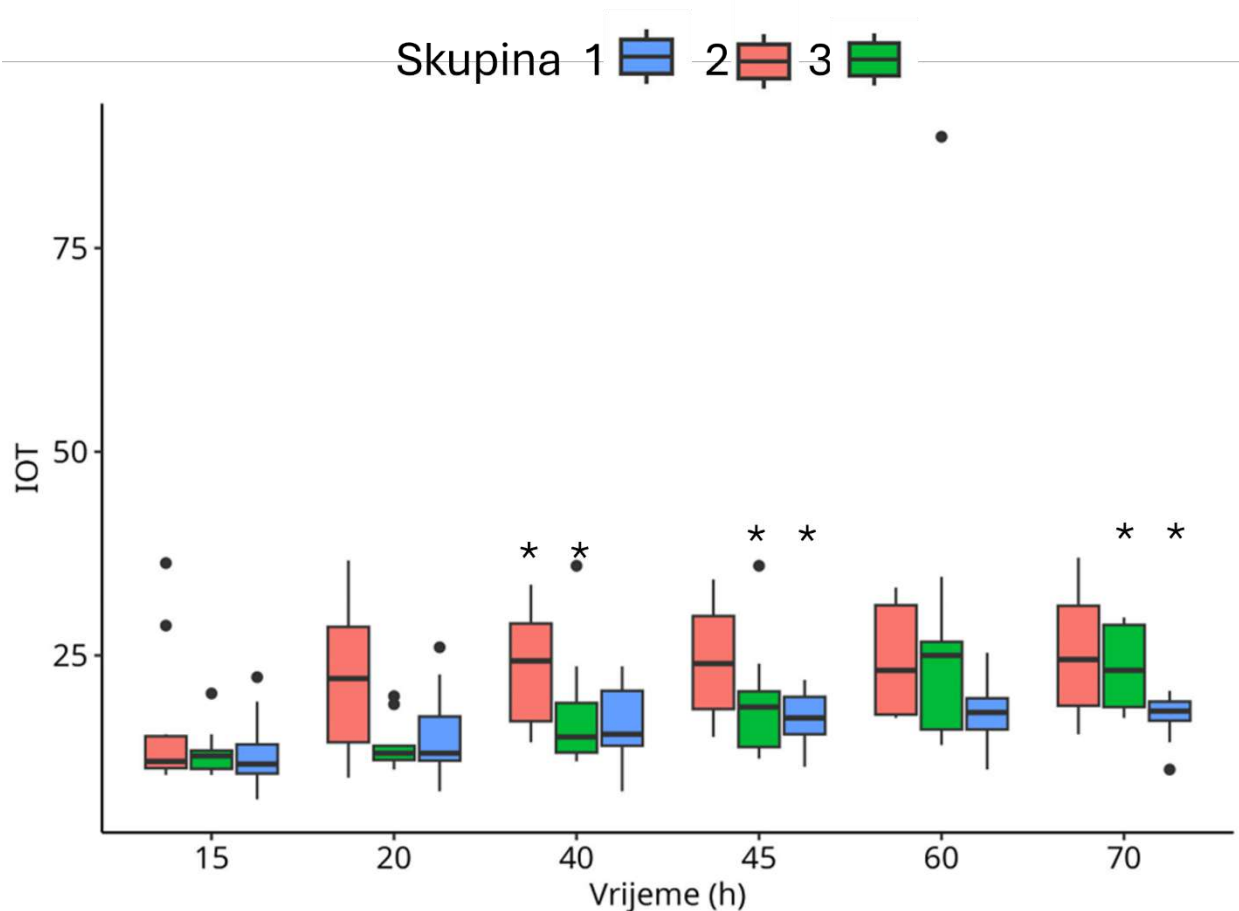
Univarijatna analiza pokazala je značajne razlike između skupina za oba načina mjerenja arterijskog tlaka — invazivnog (iSAT: $p = 2.10 \times 10^{-9}$; iDAT: $p = 1.03222 \times 10^{-6}$) i neinvazivnog (niSAT: $p = 5.06 \times 10^{-7}$; niDAT: $p = 8.13 \times 10^{-11}$), kao i izražen utjecaj vremena (iSAT: $p = 1.60 \times 10^{-11}$; niSAT: $p = 8.13 \times 10^{-11}$). Multivarijatni modeli potvrdili su značajan učinak skupine (iSAT: $p = 0.00032$; niSAT: $p = 0.0077$) i vremena (iSAT: $p = 1.33 \times 10^{-11}$; niSAT: $p = 2.00 \times 10^{-10}$), dok interakcija skupina $\times$ vrijeme nije bila značajna u oba modela. Statistički su značajne odstupajuće vrijednosti (iSAT: $p = 1.14 \times 10^{-27}$; niSAT: $p = 7.05 \times 10^{-24}$). Usporedba pojedinačnih skupina pokazala je da skupina 3 dosljedno održava najviše vrijednosti tlaka, u odnosu na skupinu 2 i 1. Za iSAT, skupina 3 značajno nadmašuje skupinu 2 u gotovo svim vremenskim točkama, 20 min: $p = 0.002$; 40 min: $p = 0.0003$; 45 min: $p = 0.0056$; 60 min: $p = 0.0147$; 70 min: $p = 0.0267$ (Tablica 16.), dok razlike između skupine 2 i skupine 1 nisu značajne ($p > 0.1$). Slični trendovi vidljivi su i za niSAT te dijastolički tlak (iDAT/niDAT), gdje skupina 3 pokazuje značajno veće vrijednosti u odnosu na skupinu 1 i 2 u kasnijim minutama (niDAT 40 min: $p = 0.0046$; 70 min: $p = 0.0227$).

Tablica 16. Vrijednosti invazivno i neinvazivno mjerenog dijastoličkog arterijskog tlaka u šest vremenskih točkaka unutar tri skupine. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina u vremenskim točkama označena je slovima (A, B, C, D, E, F)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	iDAT (mmHg) – srednja vrijednost	niDAT (mmHg) – srednja vrijednost
1	20	10	$49,8 \pm 4,61$	$50,4 \pm 8,88$
	40	10	$50,8 \pm 4,37$	$51,2 \pm 10,50$ A
	45	10	$56,7 \pm 9,06$	$55,6 \pm 8,14$
	60	10	$58,6 \pm 14,61$	$58,3 \pm 11,99$
	70	10	$55,7 \pm 14,96$ E	$57,6 \pm 10,18$
2	20	10	$47,1 \pm 9,19$ A	$45,4 \pm 13,72$
	40	10	$47,4 \pm 9,62$ B	$45,6 \pm 14,23$ A
	45	10	$53,2 \pm 13,01$ C	$53,6 \pm 19,91$
	60	10	$59,9 \pm 10,83$ D	$58,3 \pm 11,99$
	70	10	$67,3 \pm 6,93$	$57,6 \pm 10,18$
3	20	10	$62,8 \pm 9,02$ B	$60,2 \pm 5,88$
	40	10	$64,9 \pm 12,55$ A	$64,3 \pm 11,37$ B
	45	10	$72,3 \pm 14,26$ D	$62,5 \pm 12,92$
	60	10	$71,1 \pm 14,95$ C	$68,8 \pm 16,94$
	70	10	$73,2 \pm 13,99$ F	$73,4 \pm 16,05$

5.4.5. Analiza vrijednosti intraokularnog tlaka tijekom perioperacijskog razdoblja

Univarijatna analiza pokazala je značajne razlike među skupinama analgetika ($p = 0.00025$) i kroz vrijeme perioperacijskog razdoblja ($p = 4.89 \times 10^{-11}$). Multivarijatni modeli potvrdili su značajan učinak vremena ($p = 0.0388$) i random efekta ($p = 2.69 \times 10^{-5}$), dok interakcija skupina $\times$ vrijeme ($p = 0.161$) i sam učinak skupine ($p = 0.589$) nisu bili značajni. Ovo ukazuje da se dinamika promjena intraokularnog tlaka tijekom perioperativnog razdoblja ne razlikuje bitno među analgeticima, a individualne varijacije među životinjama doprinose ukupnoj varijabilnosti. Usporedba pojedinačnih skupina pokazala je da su većina razlika nesignifikantne ($p > 0.05$), iako su zabilježene kratkotrajne značajne razlike između fentanila i levobupivakaina na 40. minuti ($p = 0.031$) te između fentanila i metadona na 45. i 70. minuti ($p = 0.042$ i $p = 0.019$) (Slika 14.).



Slika 14. Prikaz intraokularnog tlaka u šest vremenskih točaka unutar tri skupine. Crnim točkama označene su odstupajuće vrijednosti u pojedinim vremenskim točkama. Asterisk označava statistički značajne vrijednosti skupine 2 i 3 u 40 vremenskoj točki, između skupine 1 i 3 u 45 vremenskoj točki te između skupine 1 i 3 u 70 vremenskoj točki.

5.4.6. Analiza promjera zjenice oka tijekom perioperacijskog razdoblja

Univarijatna analiza pokazala je da apsolutne razlike u promjeru zjenice među skupinama analgetika nisu značajne ($p = 0.0608$), dok je vrijeme perioperacijskog razdoblja imalo značajan učinak na promjer zjenice ($p = 0.00075$). Multivarijatni modeli potvrdili su značajnu interakciju skupina $\times$ vrijeme ($p = 2.95 \times 10^{-5}$), što ukazuje da dinamika promjene zjenice kroz vrijeme ovisi o primijenjenom analgetiku (Tablica 18.), dok sam učinak skupine nije bio značajan ($p = 0.450$). Učinak vremena bio je izrazito značajan ($p = 1.89 \times 10^{-38}$), te značajne odstupajuće vrijednosti ($p = 6.89 \times 10^{-69}$). Statistički je značajna razlika između skupine 1 i 3 u 20. minuti ($p = 0.032$)

Tablica 18. Vrijednosti promjera zjenice u šesti vremenskih točka unutar tri skupine. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između skupina u vremenskoj točki označena je slovom (A, B)

Skupina	Vremenska točka	Broj životinja (n)	Vrijednost (mm)	Min-Max (mm)
1	15	10	$1.740 \pm 0,167$	1.6–2.0
	20 A	10	$1.765 \pm 0,106$	1.6–2.0
	40	10	$1.795 \pm 0,138$	1.6–2.1
	45	10	$1.810 \pm 0,120$	1.7–2.1
	60	10	$1.820 \pm 0,121$	1.7–2.1
	70	10	$1.815 \pm 0,125$	1.7–2.1
2	15	10	$1.689 \pm 0,190$	1.5–2.1
	20	10	$1.710 \pm 0,179$	1.5–2.1
	40	10	$1.780 \pm 0,220$	1.6–2.3
	45	10	$1.845 \pm 0,252$	1.6–2.5
	60	10	$1.880 \pm 0,267$	1.7–2.6
	70	10	$1.910 \pm 0,274$	1.7–2.6
3	15	10	$1.633 \pm 0,058$	1.6–1.7
	20 B	10	$1.640 \pm 0,107$	1.5–1.8
	40	10	$1.690 \pm 0,120$	1.5–1.8
	45	10	$1.710 \pm 0,149$	1.4–1.85
	60	10	$1.780 \pm 0,140$	1.5–1.9
	70	10	$1.792 \pm 0,131$	1.5–1.92

6. RASPRAVA

Analiza vrijednosti kopeptina, kortizola i haptoglobina pokazuje da je perioperacijski stres dobro kontroliran u svim skupinama, što ukazuje da je primijenjeni analgetski protokol bio dostatan. Iako se nisu uočile statističke korelacije između kopeptina, kortizola i haptoglobina vrijednosti su bile ujednačene, što potvrđuje učinkovitost analgezije i ograničava izražen stresni odgovor. Usporedba različitih analgetika pokazuje da levobupivakain pruža optimalnu modulaciju bioloških pokazatelja stresa. Vrijednosti kopeptina i kortizola u skupini tretiranoj levobupivakainom ostale su stabilne tijekom cijelog promatranog razdoblja, dok su efntanil i metadon pokazali veće varijacije u određenim vremenskim točkama. Posebno je uočeno da su koncentracije haptoglobina kod levobupivakaina značajno niže u svim vremenskim točkama, što upućuje na učinkovitiju kontrolu akutnog faznog odgovora i smanjenje biokemijskog stresa. Tijekom istraživanja, najveća odstupanja zabilježena su u pojedinačnim vrijednostima unutar skupina, što potvrđuje izrazito značajne odstupajuće vrijednosti u multivarijantnoj analizi. Ovaj nalaz naglašava da interindividualna varijabilnost ima ključnu ulogu u odgovoru na stres, čak i kada je primijenjen kvalitetan analgetski protokol.

Rezultati potvrđuju da modulacija perioperacijskog stresa ovisi ne samo o vrsti analgetika, već i o mehanizmu djelovanja i individualnoj osjetljivosti. Levobupivakain, primijenjen epiduralno, pokazuje prednost u održavanju ujednačenih vrijednosti kortizola i kopeptina te značajnijeg smanjenja haptoglobina u odnosu na intravenozne opioide, što ga čini optimalnim izborom za kontrolu stresnog odgovora. U skladu s literaturnim podacima (HAROUTOUNIAN, 2018; IVASCU i sur., 2024.), ovi nalazi naglašavaju važnost pažljivog odabira analgetika i protokola primjene, uzimajući u obzir interindividualne razlike, kako bi se maksimalno smanjio biokemijski i fiziološki stres u perioperacijskom razdoblju.

6.1. Biološki pokazatelji stresa tijekom perioperacijskog razdoblja

Kopeptin je pokazao ujednačene vrijednosti u skupini životinja koje su primale levobupivakain, gdje su uočava pad vrijednosti kopeptina kroz ispitivani period. Takav nalaz

sugerira da epiduralna primjena levobupivakain održava konzistentan i relativno nizak neuroendokrini odgovor na operacijski stres (UZUNLAR i sur., 2021.; LIN i sur., 2025.). Skupina ovaca kojoj je primijenjen fentanil pokazala je niže početne vrijednosti kopeptina u odnosu na ostale skupine, uz blagi porast u trećoj vremenskoj točki, te ponovni pad vrijdnosti u trećoj vremenskoj točki što potvrđuje da fentanil osigurava učinkovit i pouzdan analgetski učinak uz minimalnu aktivaciju HPA osi (HAROUTOUNIAN, 2018.). Nasuprot tome, metadon je bio povezan s najvišim i najvarijabilnijim vrijednostima kopeptina, što upućuje na izraženiji i heterogen stresni odgovor u ovoj skupini. Nalazi rezultata istraživanja su u skladu s literaturom koja potvrđuje kopeptin kao pouzdan pokazatelj aktivacije HPA osi u perioperacijskim uvjetima (MORGENTHALER i sur., 2006; KATAN i sur., 2009), iako podaci o njegovom odnosu s pojedinim analgeticima još uvijek ostaju ograničeni (VON RECUM i sur., 2015.; JALLEH i TORPY (2021.

Sličan obrazac uočen je i kod kortizola. Najniže vrijednosti zabilježene su u skupini s fentanilom, što potvrđuje njegovu sposobnost da učinkovito smanji endokrini stresni odgovor. To je u skladu s nalazima Haroutouniana (2018), koji opisuje da opiodi mogu inhibirati lučenje CRH, smanjiti odgovor hipofize i djelovati izravno na nadbubrežnu žlijezdu. U skupini s levobupivakainom kortizol je bio nešto viši u ranim mjerenjima, ali su u trećoj vremenskoj točki zabilježene najniže vrijednosti kortizola u usporedbi s drugom skupinama, što upućuje na povoljan učinak epiduralne blokade u kasnijoj fazi poslijeoperacijskog razdoblja (DAVID i sur., 2007.). Rezultati se podudaraju s istraživanjima koja su pokazala smanjene razine vrijednosti kortizola nakon epiduralne primjene levobupivakaina u različitim kirurškim i eksperimentalnim modelima (BAYAZIT i sur., 2013; AHISKALIOGLU i sur., 2016; PERSEC i sur., 2009; RANGAPRIYA i sur., 2023). Nasuprot tome, metadon je bio povezan s povišenijim i neujednačenim vrijednostima kortizola kroz sve tri vremenske točke, što upućuje na izraženiji i produljeni stresni odgovor, u skladu s podacima da primjena metadona može utjecati na funkciju nadbubrežne žlijezde i regulaciju stresa (ZOJAJI i sur., 2023; YANG i sur., 2016; PSARIANOS i sur., 2025).

Analiza vrijednosti haptoglobina također je ukazala na razlike među skupinama. U skupini ovaca koje su primale metadon haptoglobin je bio povišen i varijabilan kroz sve tri vremenske točke, što potvrđuje izraženiji stresni i upalni odgovor u odnosu na fentanil i levobupivakain

(GARRIDO i TROCÓNIZ, 1999.). Kod životinja koje su primale fentanil, vrijednosti su pokazivale oscilacije s tendencijom porasta u trećoj vremenskoj točki što može odražavati blagi akutnofazni odgovor, budući da je haptoglobin poznat kao osjetljiv pokazatelj upale i stresa kod ovaca (SACERDOTE i sur., 2008.; KHALIL I AL-HUMADI, 2020.). U skupini s levobupivakainom vrijednosti haptoglobina bile su dosljedno niže nego u skupinama s fentanilom i metadonom, što upućuje na manji upalni odgovor i smanjenu aktivaciju akutne faze. Ovi rezultati podudaraju se s literaturom koja navodi da epiduralna blokada može reducirati sistemsku upalnu reaktivnost (LYKKEGAARD i sur., 2005; LIN i sur., 2025).

6.2. Biokemijski pokazatelji akutnog stresnog odgovora u perioperacijskom razdoblju

6.2.1. Hepatocelularna funkcija uslijed stresa tijekom operacijskih zahvata

Dobiveni rezultati ukazuju da primjena metadona, fentanila i levobupivakaina dovodi do značajnog porasta vrijednosti ALT-a u vremenskoj točki 24 u odnosu na vremensku točku 0. Uočeno je da se razlike najviše manifestiraju između početne i završne vremenske točke, dok rane promjene (0–3) nisu statistički značajne, što sugerira da povišenje ALT-a ima odgođeni karakter.

U skupini s metadonom prisutan je najizraženiji učinak s visoko značajnim porastom ALT-a u vremenskoj točki 24, dok je u skupini fentanil zabilježen umjeren porast ALT-a u 24. satu. Levobupivakain je pokazao sličan obrazac, s jasnim razlikama između 0–24 i 3–24 sata. Promjene vrijednosti ALT-a odgovaraju nalazima iz literature koja opisuju prolazna postoperacijska povišenja transaminaza unutar 24–48 sati, što se najčešće pripisuje kirurškom stresu i hemodinamskim fluktuacijama, a ne specifičnom učinku pojedinog analgetika (TAN i sur., 2003.). Pritom je zanimljivo da je upravo u skupini levobupivakain zabilježena veća interindividualna varijabilnost, što se može povezati s njegovim dominantno hepatičkim metabolizmom (PAVLICA i sur., 2022.).

S obzirom da ALT predstavlja specifičan marker hepatocelularnog oštećenja, dobiveni nalazi mogu ukazivati na potencijalni hepatotoksični učinak, izraženiji kod metadona, dok

levobupivakain i fentanil pokazuju blaži, ali ipak statistički značajan porast. Random efekti u multivarijantnoj analizi ukazuju na varijabilnost individualnog odgovora, što može biti posljedica bioloških razlika između životinja. Rezultati istraživanja u skladu su s ranijim istraživanjima koja ukazuju da opiodi i lokalni anestetici mogu modulirati hepatocelularne enzime kroz mehanizme koji uključuju oksidativni stres, metabolizam u jetri i sekundarne upalne procese (AMRAEI i sur., 2018.).

Analiza vrijednosti AP-a u ovoj studiji pokazuje da primjena fentanila izaziva značajnu promjenu između vremenskih točaka 0 i 24 h, dok primjena levobupivakaina i metadona ne uzrokuje slične promjene. Ovaj nalaz sugerira da fentanil ima brži ili izraženiji farmakološki učinak u promatranom vremenskom okviru.

Slična pojava opisana je u literaturi, gdje je kod kratkotrajne primjene metadona zabilježena manja hepatotoksičnost u usporedbi s drugim opiodima, dok su povišenja jetrenih enzima češća kod kroničnih korisnika opioda zbog kumulativnog učinka i pridruženih komorbiditeta (AMRAEI i sur., 2018). Povećane vrijednosti jetrenih enzima također mogu odražavati različitu osjetljivost hepatobilijarnog sustava na opioide, ali i učinke hemodinamskih oscilacija izazvanih perioperacijskim stresom. U skladu s tim, opiodi, osobito fentanil, mogu interferirati s bilijarnom ekskrecijom i prolazno povisiti vrijednosti jetrenih enzima (SMITH i VALE, 2006). Slični obrasci opaženi su i u životinjskim modelima, gdje je naglašena važnost interindividualne metaboličke sposobnosti (PAVLICA i sur., 2022). Ovi obrasci su u skladu s literaturom koja opisuje da anesteziološki postupci, bez obzira na vrstu primijenjene analgezije, mogu prolazno utjecati na aktivnost jetrenih enzima (HMZA i sur., 2024.), pri čemu rezultati ovog istraživanja dodatno naglašavaju važnost interindividualnih razlika i farmakokinetičkih specifičnosti pojedinih lijekova.

Univarijatna analiza ističe statistički značajne razlike između skupina i kroz vrijeme, međutim, multivarijatna analiza s miješanim efektima pokazuje da fiksni efekti (grupa, vrijeme i interakcija grupa $\times$ vrijeme) nisu statistički značajni, dok su random efekti bili značajni. Ovaj nalaz sugerira da individualna varijabilnost među ispitanicima igra dominantnu ulogu.

Rezultati analize AST-a pokazuju da se vrijednosti značajno mijenjaju tijekom vremena, neovisno o skupini lijeka. Učinak vremena ima dominantnu ulogu, dok primjena metadona,

fentanila i levobupivakaina ne dovodi do statistički značajnih razlika u vrijednostima AST-a. Iako su uočeni trendovi povišenja AST-a u vremenskoj točki 24, osobito kod skupina koje su primale fentanil i metadon, razlike između skupina nisu bile značajne. Ovo sugerira da porast AST-a nije specifično vezan uz pojedini lijek, nego vjerojatno predstavlja nespecifičan odgovor organizma na eksperimentalne uvjete ili opterećenje jetre.

S obzirom na to da je AST manje specifičan pokazatelj hepatocelularnog oštećenja od ALT-a jer se nalazi i u drugim tkivima poput mišića, uočene promjene mogu odražavati i sistemske procese uz same hepatične efekte (HAN i sur., 2023.). Statistički značajni random efekti dodatno upućuju na varijabilnost među životinjama, što potvrđuje heterogenost odgovora na isti tretman. Dobiveni nalazi sugeriraju da, iako AST pokazuje značajnu dinamiku kroz vrijeme, nije pouzdan za diferencijaciju hepatotoksičnog učinka pojedinih lijekova, dok ALT daje osjetljiviju sliku.

Vrijednosti serumskog bilirubina u ovom istraživanju pokazale su značajne razlike među skupinama i tijekom vremena. Najizraženije razlike uočene su u prvoj i drugoj vremenskoj točki, i to ponajprije između skupine koja je primala levobupivakain u odnosu na fentanil i metadon. Levobupivakain se povezuje sa značajno višim vrijednostima bilirubina u usporedbi s fentanilom u prvoj i drugoj vremenskoj točki te metadonom u drugoj vremenskoj točki što može upućivati na jači i neposredan utjecaj na hepatobilijarni metabolizam nakon primjene. Nasuprot tome, fentanil i metadon nisu pokazali međusobne razlike u nijednoj vremenskoj točki, što sugerira sličan učinak na koncentraciju bilirubina. U obje skupine zabilježen je porast vrijednosti bilirubina u drugoj vremenskoj točki, što može odražavati prolaznu stimulaciju bilijarnog protoka izazvanu opioidima. Takav je nalaz u skladu s istraživanjima Thompsona (2001) i Wua i sur. (2004), koji navode da opioidni analgetici mogu uzrokovati privremeni porast tlaka u žučnim kanalima. S druge strane, Mirani Toradeh i sur. (2020) iznose da dugotrajna primjena metadona može rezultirati kumulativnim porastom bilirubina, što upućuje na njegov potencijalni utjecaj na bilijarni sustav.

Dodatno, značajne odstupajuće vrijednosti u ovom istraživanju ukazuju na prisutnost individualnih razlika u odgovoru, što je od posebne važnosti pri interpretaciji nalaza. Takva varijabilnost može odražavati razlike u metaboličkoj aktivnosti ili osjetljivosti jetre na primijenjene lijekove, što potencijalno utječe na kliničku relevantnost zabilježenih promjena.

6.2.2. Metabolički odgovor na akutni stres

6.2.2.1. Promjene vrijednosti serumske glukoze posredovane perioperacijskim stresom

Rezultati disertacije pokazali su da je vrijeme glavni čimbenik koji utječe na promjene vrijednosti glukoze, dok među skupinama nije utvrđena statistički značajna razlika. Ipak, uočene su različite dinamike porasta glukoze ovisno o primijenjenom lijeku.

U skupini koja je primila metadon uočen je rani porast glukoze u 3. satu, koji se održao i dodatno intenzivirao u 24. satu. Ovo je u skladu s literaturom koja ukazuje na to da metadon može uzrokovati promjene u metabolizmu ugljikohidrata, djelomično posredovane opioidnim receptorima i stresnim odgovorom organizma (TAHERGORABI i sur., 2019.). Kod skupine koja je primila fentanil zabilježen je postupni i kontinuirani porast glukoze već nakon 3 sata, s najvišim vrijednostima u 24. satu. Ovakav nalaz podudara se s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da opiodi, uključujući fentanil, mogu utjecati na metabolizam glukoze modulacijom simpatičkog živčanog sustava i sekrecije kortizola, što dovodi do povećane glukoneogeneze i glikogenolize (LEE i sur., 2011.; MARIK i BELLOMO, 2013.; HELANDER i sur., 2019.).

Za razliku od opioda, u skupini koja je primala levobupivakain nije uočen rani porast glukoze. Promjene postaju značajne tek nakon 24 sata, što može upućivati na indirektan učinak lokalnog anestetika koji nije izravno metabolički, već posredovan fiziološkim odgovorom organizma tijekom duljeg vremena, što je u skladu s ranijim istraživanjima o minimalnom metaboličkom učinku epiduralnih anestetika (YILMAZ i sur., 2010.). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da opiodi imaju brži i izraženiji učinak na povišenje glukoze u odnosu na levobupivakain.

6.2.2.2 Utjecaj perioperacijskog stresa na razine serumskih proteina i albumina

Rezultati disertacije ukazuju da primjena različitih analgetika dovodi do razlika u koncentraciji serumskih proteina, dok vrijeme samo po sebi ne utječe značajno na njihovu dinamiku. Najizraženiji učinak uočen je u skupini koja je primala metadon, gdje su u drugoj i trećoj vremenskoj točki zabilježene više vrijednosti u usporedbi sa skupinom kojoj je primijenjen fentanilom, a u drugoj vremenskoj točki i u odnosu na skupina koja je dobivala levobupivakain.

Ovaj nalaz može sugerirati da metadon, za razliku od fentanila i levobupivakaina, ima potencijalno izraženiji učinak na metaboličku regulaciju proteina, što je u skladu s literaturom koja povezuje opioide s modulacijom jetrene sinteze proteina (HELANDER i sur., 2019.).

Značajni random efekti dodatno potvrđuju postojanje individualnih varijacija u odgovoru, što može biti posljedica razlika u jetrenom metabolizmu, nutritivnom statusu ili farmakogenetskim čimbenicima životinja. Dobiveni rezultati ukazuju na to da tip primijenjenog analgetika može modulirati serumske vrijednosti albumina. Najkonzistentniji učinak zabilježen je kod fentanila, gdje su vrijednosti albumina bile više u odnosu na levobupivakain u svim vremenskim točkama. Ovo može odražavati razlike u učinku na sintezu proteina u jetri ili na distribuciju albumina u plazmi pod utjecajem opioida i lokalnih anestetika. U literaturi postoje istraživanja da lokalni anestetici, uključujući levobupivakain, mogu smanjiti sintezu proteina hepatocita putem oksidativnog stresa i poremećaja ionske homeostaze, (RAMOS-TOVAR i MURIEL, 2020.) što bi moglo objasniti niže vrijednosti albumina u ovoj skupini.

Nedostatak značajnih razlika između fentanila i metadona sugerira sličan učinak ova dva opioida na homeostazu albumina, dok je levobupivakain izdvojen kao skupina s potencijalno većim negativnim učinkom na koncentraciju albumina. Značajni random efekti uočeni u multivarijatnom modelu ukazuju na postojanje individualnih varijacija, što može odražavati različitu osjetljivost jetre ili nutritivni status pojedinih životinja.

6.3. Hematološke promjene krvnih parametara tijekom kirurškog stresa

Rezultati analize broja eritrocita pokazali su značajne promjene tijekom perioperativnog razdoblja, što je u skladu s poznatim fiziološkim odgovorom organizma na kirurški stres. Naime, stres povezan s operacijskim zahvatom aktivira simpatički živčani sustav i HPA os, što dovodi do povećanja razine kortizola i katekolamina. Ovi hormoni utječu na redistribuciju eritrocita, mobilizaciju rezervnih stanica iz slezene te regulaciju volumena cirkulirajuće krvi (DESBOROUGH, 2000.).

Univarijatna analiza pokazala je da se broj eritrocita značajno mijenjao kroz vrijeme (ANOVA $p < 0,001$), dok usporedbe između pojedinih skupina pokazuju jedino statističku značajnu razliku u drugoj vremenskoj točki između skupine 1 i 3 što sugerira da anestetici mogu imati kratkotrajan utjecaj na broj eritrocita. Međutim, multivarijatna analiza pokazala je da je vrijeme glavni čimbenik promjene broja eritrocita, dok interakcija između skupine i vremena nije bila značajna. To ukazuje da je perioperativni vremenski tijek, a ne specifična farmakološka intervencija, dominantan u modulaciji eritrocitnih vrijednosti. Vrijednosti eritrocita, u sve tri skupine pokazuju kumulativni porast broja eritrocita. Posebno izražen u trećoj vremenskoj točki, što se može pripisati hemokoncentraciji uslijed gubitka tekućine, smanjenja plazmatskog volumena ili simpatičke aktivacije kao dijelom odgovora na operacijski stress. Ovi nalazi potvrđuju prethodne studije koje ističu da perioperativne hemodinamske promjene, gubitak krvi, infuzija tekućina i stresna reakcija značajno utječu na koncentraciju eritrocita (DE WITTE i SESSLER, 2002.).

Rezultati analize hematokrita pokazuju da promjene u perioperativnom periodu primarno ovise o vremenskom toku, a ne o odabiru anestetika. Razlike u drugoj vremenskoj točki između skupine levobupivakain i metadon te fentanil i levobupivakain odražavaju privremeno aktiviranje simpatičkog živčanog ili redistribuciju tekućine. Analiza kroz vrijeme pokazala je da je faktor vremena statistički značajan (ANOVA $p \approx 9 \times 10^{-12}$), što potvrđuje da hematokrit značajno varira tijekom perioperacijskog perioda neovisno o grupi. Multivarijatna analiza (lmer model) dodatno je potvrdila da interakcija između grupe i vremena nije značajna ($p = 0,474$), dok je sam faktor vremena ostao značajan ($p = 0,00015$). Značajne odstupajuće vrijednosti ($p \approx 1 \times 10^{-6}$) ukazuju na prisutnost individualne varijabilnosti među životinjama.

Rezultati istraživanja ukazuju da promjene hematokrita u ranim postoperativnim satima prvenstveno odražavaju fiziološki odgovor na operaciju i perioperativni stres, uključujući redistribuciju tekućine i odgovor organizma, a ne direktan učinak primijenjenih anestetika. Kratkotrajne razlike između levobupivakaina, fentanila i metadona u drugoj vremenskoj točki stoga se mogu smatrati privremenim i biološki razumljivim. Nalazi istraživanja su u skladu s prethodnim studijama koje sugeriraju minimalan dugoročni utjecaj različitih anestetika na hematokrit te ističu važnost perioperativnog stresa i individualne varijabilnosti u interpretaciji postoperativnih hematoloških parametara (KE i sur., 2020.; QURAISHI i sur., 2022).

Analiza vrijednosti leukocita pokazuje da promjene broja leukocita tijekom perioperativnog perioda prvenstveno ovise o vremenu, a ne o tipu primijenjenog anestetika. Univarijatna analiza između grupa u 24. postoperativnom satu zabilježene su značajne razlike između fentanila i levobupivakaina te fentanila i metadona. Rezultati sugeriraju da fentanil može inducirati značajnije promjene u broju leukocita u usporedbi s ostalim ispitivanim lijekovima. Rezultati sugeriraju da promjene broja leukocita u perioperativnom periodu prvenstveno odražavaju fiziološki odgovor na kirurški stres, uključujući upalne i imunološke reakcije, dok odabrani anestetici imaju minimalan ili specifično kasno izražen učinak. Razlike u trećoj vremenskoj točki mogu odražavati modulaciju imunološkog odgovora (KIM i sur., 2011.; INAGI i sur. 2016.). Nalazi su u skladu s prethodnim studijama koje pokazuju da perioperativni stres i individualna varijabilnost dominiraju u promjenama leukocita, dok anestetici u standardiziranim uvjetima operacije imaju minimalan utjecaj (REM i sur., 1980.; MARIK i BELLOMO, 2013.; HELANDER i sur., 2019). Promjene leukocita su vremenski ovisne i individualno varijabilne, a učinak anestetika je sporadičan i kratkotrajan.

6.4. Hemodinamska stabilnost uslijed primijenjenog protokola intraoperacijske analgezije

6.4.1. Respiracijska frekvencija i srčani ritam

Rezultati su pokazali da je respiracijska frekvencija najniža u skupini koja je primila metadon, a najviša u skupini s levobupivakainom, dok je skupina koja je dobila fentanil zauzela intermedijarne vrijednosti uz veću varijabilnost. Statistički značajne razlike uočene su između levobupivakaina i metadona od 20 vremenske točke do 70. Primjena metadona može izazvati depresiju disanja, fentanil ima kratkotrajni, ali izražen respiratorni učinak, dok levobupivakain minimalno utječe na ventilaciju. Multivarijatna analiza istaknula je važnu ulogu interindividualne varijabilnosti. Povećana varijabilnost frekvencije disaja tijekom vremena upućuje na individualne razlike u respiracijskom odgovoru, povezane s farmakodinamičkim djelovanjem opioida na respiracijski centar (KOO i EIKERMANN, 2011.; NAGAPPA i sur., 2017).

Analiza srčane frekvencije pokazala je statistički značajne razlike između skupina, osobito u vremenskim točkama od 40. do 70. minute, gdje je primjena fentanila dovela do nižih vrijednosti HR u usporedbi s levobupivakainom i metadonom. Ovakav nalaz upućuje na izraženiji depresorni učinak fentanila na autonomni odgovor, što je u skladu s njegovim poznatim farmakodinamskim svojstvima i snažnim simpatolitičkim učinkom. Iako je vremenski faktor sam po sebi imao manji utjecaj, interakcija između grupe i vremena pokazala se značajnom, što sugerira da se učinci pojedinih analgetika mijenjaju ovisno o fazi zahvata i trajanju izloženosti. Levobupivakain je održavao ujednačeniji ritam bez izraženih oscilacija, dok je metadon pokazivao veću varijabilnost između jedinki (DAHAN i sur., 2010). Multivarijatna analiza istaknula je značajnost odstupajućih vrijednosti ukazuje da su najveća odstupanja zabilježena na razini pojedinačnih životinja, što potvrđuje važnost individualnog pristupa u procjeni analgezije i interpretaciji hemodinamskih odgovora. Takva varijabilnost ne umanjuje učinak analgetika, već naglašava biološku raznolikost u odgovoru na stres i farmakološku stimulaciju.

6.4.2. Promjene sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka mjerene invazivnom i neinvazivnom metodom

Rezultati pokazuju visoku podudarnost između invazivnog (iSAT) i neinvazivnog (niSAT) mjerenja arterijskog tlaka, pri čemu invazivno mjerenje preciznije detektira kratkotrajne oscilacije, dok neinvazivno pouzdano prati ukupni hemodinamski trend. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da različiti analgetici imaju značajan učinak na arterijski tlak kod životinjskog modela, a razlike su dosljedno zabilježene i kod invazivnog (iSAT/iDAT) i neinvazivnog (niSAT/niDAT) mjerenja. Multivarijatna analiza potvrđuje da su učinci skupine i vremena značajni, dok interakcija skupina × vrijeme nije, što sugerira da razlike među analgeticima ostaju stabilne tijekom cijelog promatranog perioda.

Fentanil je pokazao najstabilniji hemodinamski profil, s nižim i dosljedno stabilnim vrijednostima sistolnog i dijastoličkog tlaka, te minimalnim oscilacijama. Metadon je imao umjerene vrijednosti tlaka, slične fentanilu, bez značajnih odstupanja. Suprotno tome,

levobupivakain je održavao najviše vrijednosti tlaka, kako sistolnog, tako i dijastolnog, tijekom cijelog promatranog perioda, s jasnim razlikama u odnosu na fentanil. Ovi rezultati ukazuju da levobupivakain uzrokuje izraženiji hemodinamski učinak. Opioidi poput fentanila i metadona smanjuju simpatikotonus čime djeluju stabilizirajuće na arterijski tlak. U prisutnosti opioida tlak pokazuje manji porast u usporedbi s izostankom analgezije ili primjenom analgetika koji ne smanjuju značajno simpatikotonus, poput levobupivakaina. Levobupivakain epiduralno djeluje lokalno i može blokirati simpatički živčani sustav, ali zbog promjena raspodjele volumena i refleksnih reakcija može doći do povišenja prosječnog tlaka u nekim slučajevima, osobito u usporedbi s opioidima. Klinčke studije o levobupivakainu pokazuju da epiduralna primjena lokalnih anestetika mijenja hemodinamiku kroz blokadu simpatičkog sustava (KABIR i sur., 2025.) Rezultati istraživanja ukazuju da izbor analgetika može imati različit učinak na hemodinamsku stabilnost tijekom operacijskog zahvata, pri čemu su fentanil i metadon prikladniji za održavanje nižeg i stabilnijeg sistoličkog tlaka, što je poznato i iz nalaza literature (HUANG i sur., 2021.). Trendovi između invazivnog i neinvazivnog mjerenja pokazali su visoku podudarnost u smjeru i značajnosti promjena. Invazivno mjerenje (iSAT/iDAT) pokazalo je veću osjetljivost na kratkotrajne oscilacije, dok neinvazivno mjerenje (niSAT/niDAT) precizno odražava ukupni trend, što potvrđuje njegovu pouzdanost u praćenju hemodinamskog odgovora bez potrebe za invazivnim postupcima (PETERSEN i sur., 2014.; LAM i sur., 2021.; NEDEL i sur., 2022.).

Značajne idstupajuće vrijednosti u modelima ukazuje na važnost individualnih bioloških razlika među životinjama, što je tipično za eksperimentalne biološke modele. Ovi podaci naglašavaju da, iako levobupivakain ima najjači učinak na tlak, fentanil i metadon ostaju stabilni analgetici s minimalnim oscilacijama, što može biti ključno pri odabiru analgetika u eksperimentalnim i kliničkim uvjetima.

6.5. Promjene intraokularnog tlaka i promjera zjenice oka uslijed primjene različite intraoperacijske analgezije

Skupina životinja koja je primila fentanil pokazala je najveće vrijednosti IOT u gotovo svim vremenskim točkama u usporedbi s ostalim skupinama. Najizraženije povećanje zabilježeno je između 20 i 60 minuta, uz značajnu varijabilnost među jedinkama, što je vidljivo kroz širi interkvartilni raspon i prisutnost odstupajućih vrijednosti. Ovaj porast IOT-a može se objasniti stimulacijom simpatičkog živčanog sustava koju opiodi poput fentanila induciraju, što dovodi do vazokonstrikcije intraokularnih krvnih žila i povećanja očnog volumena. Slični nalazi dokumentirani su u literaturi, gdje Mrazova i sur. (2018.) te Gomez-Martinez i sur. (2020.) navode da intravenska primjena fentanila može značajno povećati IOT, pri čemu dolazi i do promjene promjera zjenice.

U skupini životinja koje su primile levobupivakain uočava se umjereni porast IOT-a tijekom vremena. Početne vrijednosti bile su niže, dok u vremenskim točkama 60 i 70 minuta dolazi do postupnog povećanja tlaka uz širenje interkvartilnog raspona. Ovi nalazi ukazuju na kontroliraniji hemodinamski odgovor i slabiji simpatički učinak u usporedbi s fentanilom.

Skupina životinja koja je primala metadon pokazala je najstabilnije vrijednosti IOT-a. Box-plotovi su uski, s malim interkvartilnim rasponom i minimalnim odstupajućim vrijednostima, a tlak je ostao stabilan kroz sve vremenske točke, što odgovara metadonom stabilizirajućem učinku na simpatikotonus.

Analiza promjera zjenice (PZ) pokazala je sličan obrazac. Skupina fentanila bilježi najizraženiji porast PZ-a, osobito nakon 40 minuta, uz povećanje medijana i interkvartilnog raspona te prisutnost odstupajućih vrijednosti, što može odražavati individualnu razliku u simpatičkom odgovoru i učinak fentanila na kontrakciju ili dilataciju zjenice. Levobupivakain izaziva postupno širenje zjenice od 40 minuta nadalje, s nešto manjom varijabilnošću, dok metadon održava PZ gotovo konstantnim tijekom cijelog promatranog razdoblja.

Ovi rezultati ukazuju postojanje korelacije između širenja zjenice i porasta IOT-a, osobito u skupini životinja koje su primile fentanil. Porast IOT-a i PZ može se povezati s opioidnim

modulacijama simpatičkog tonusa, vazokonstrikcijom i promjenama intraokularne cirkulacije, što je u skladu s literaturnim nalazima (MRAZOVA i sur., 2018.; GOMEZ-MARTINEZ i sur., 2020.). Skupina životinja koja je primala levobupivakain pokazuje umjereniji i stabilniji učinak na IOT I PZ, dok skupina koja je primala metadon pokazuje najstabilniji odgovor.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju analize rezultata provedenih protokola intraoperacijske analgezije u tri vremenenske točke s ciljem procjene bioloških pokazatelja stresa, a uz primjenu fentanila, metadona i epiduralno primijenjenog levobupivakaina formulirani su sljedeći zaključci:

1. Kopeptin, kortizol i haptoglobin su pouzdani pokazatelji perioperacijskog akutnog stresnog odgovora kod ovaca, pri čemu se kopeptin pokazao kao najosjetljiviji i najpouzdaniji marker.
2. Epiduralna primjena levobupivakaina pruža optimalnu modulaciju stresnog odgovora, održava stabilne vrijednosti kortizola, kopeptina i značajno smanjuje haptoglobin, što ukazuje na učinkovitiju kontrolu akutnog faznog odgovora u odnosu na intravenozne opioide. Njegov učinak omogućava uravnotežen i kontroliran odgovor intraokularnog tlaka i promjera zjenice, uz nešto veću varijabilnost zbog interindividualnih razlika.
3. Fentanil osigurava stabilan i predvidljiv profil kortizola i kopeptina, održava homeostazu te pouzdano kontrolira biokemijske i hematološke parametre, ali izaziva značajnije povećanje intraokularnog tlaka i promjera zjenice u usporedbi s levobupivakainom.
4. Metadon dovodi do veće varijabilnosti u stresnim i hematološkim parametrima, ali održava stabilan intraokularni tlak i promjer zjenice.
5. Interindividualna varijabilnost (random efekt) ima ključnu ulogu u odgovoru na analgeziju, što naglašava važnost prilagodbe analgetika pojedincu radi optimizacije homeostaze i minimiziranja stresa.
6. Razlike u učinku analgetika potvrđuju da je pažljiv odabir vrste analgezije i protokola primjene ključan za učinkovitu kontrolu perioperacijskog stresa, pouzdano praćenje biokemijskih markera i dobrobit životinja u eksperimentalnim i kliničkim uvjetima.

8. POPIS LITERATURE

AHISKALIOGLU A, E. AHISKALIOGLU, A. DOSTBIL, A. CAN, M. AKSOY, M. CELIK, İ. ILKER, K. HUSNU (2016): The Effect of Epidural Levobupivacaine and Fentanyl on Stress Response and Pain Management in Patients Undergoing Percutaneous Nephrolithotomy. West. Indian. Med. J. e-pub ahead of print. doi: 10.7727/wimj.2015.095.

AL-HASHIMI, M., W. M. SCOTT, J. P. THOMPSON, D. G. LAMBERT (2013): Opioids and immune modulation: more questions than answers. Br. J. Anaesth. 111:80–88. doi: 10.1093/bja/aet153.

ARLT, W., P. M. STEWART (2005): Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 34:293-313. doi: 10.1016/j.ecl.2005.01.002.

AMRAEI, M., M. MOHAMADPOUR, M. R. HAFEZI AHMADI, M. AZIZI, A. DAEMI, M. OMIDI, E. SHIRZADPOUR (2018): Histopathological study of liver tissue due to methadone consumption and its effect on liver enzymes and inflammatory indices in rat. Drug. Des. Devel. Ther. 12, 3785-3795. doi: 10.2147/DDDT.S182032.

AYROLDI, E., L. CANNARILE, G. MIGLIORATI, G. NOCENTINI, D. V DELFINO, C. RICCARDI (2012): Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. Faseb. J. 26:4805–4820. doi: 10.1096/fj.12-216382.

BAYAZIT, E. G., K. KARAASLAN, K. OZTURAN, E. SERIN, H. KOCOGLU (2013): Effect of epidural levobupivacaine and levobupivacaine with fentanyl on stress response and postoperative analgesia after total knee replacement. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 51 652-659. doi: 10.5414/CP201862.

BUCKBINDER, L., R. P. ROBIENSON (2002): The glucocorticoid receptor: Molecular mechanism and new therapeutic opportunities. Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy.1, 127-136. doi: 10.2174/1568010023344751.

BURFORD, N.G., N.A. WEBSTER, D. CRUZ-TOPETE (2017): Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2150. doi: 10.3390/ijms18102150.

BUSILLO, J. M., J. A. CIDLOWSKI (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends. Endocrinol. Metab.* 24, 109-19. doi: 10.1016/j.tem.2012.11.005.

CARRASCO, G. A., L. D. VAN DE KAR (2003): Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* 463:235-272. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01285-8.

CECILIANI, F., A. GIORDANO, V. SPAGNOLO (2002): The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein. Pept. Lett.* 9, 211–223. doi:10.2174/0929866023408779.

CECILIANI, F., J. J. CERON P. D. ECKERSALL, H. SAUERWEIN (2012): Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics.* 75, 4207–4231. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.

CHARMANDARI, E., C. TSIGOS, G. CHROUSOS (2005): Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67:259-284. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.

CLARK, A., P. KING (2003): The ACTH receptor and its mutations. In: Gaillard R, editor. *The ACTH Axis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*. Boston: Kluwer Academic Publishers; pp. 171-190. doi: 10.1007/978-1-4615-0501-3.

CRUZ, F. F., P. R. M. ROCCO, P. PELOSI (2017): Anti-inflammatory properties of anaesthetic agents. *Crit. Care.* 21,1–7. doi: 10.1186/s13054-017-1645-x.

CUSACK, B., D.J. BUGGY (2020): Anaesthesia, analgesia, and the surgical stress Response. *BJA Educ.* 21, 321–328. doi: 10.1016/j.bjae.2020.04.006.

DAHAN, A., L. AARTS, T. W. SMITH (2010): Incidence, Reversal, and Prevention of Opioid induced Respiratory Depression. *Anesthesiol.* 112, 226–238. doi:10.1097/ALN.0b013e3181c38c25.

D'ARMIENTO, J., S. DALAL, K. SHADA (1997): Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. *Gene*. 195, 19–27. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00123-6.

DAVID, J. S., C. FERRETI, J. AMOUR, B. VIVIEN, O. EVE, P. PETIT, B. RIOU, P. Y. GUEUGNIAUD (2007): Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. *Can. J. Anaesth.* 54, 208–217. doi:10.1007/BF03022642.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., B. SINGH, M. S. WHITNEY, F. V. BAZER (2000): Acute-phase proteins and hematologic values in ovine lentivirus-infected lambs treated with recombinant ovine IFN- τ . *J. Interf. Cytokine. Res.* 20, 41–53. doi:10.1089/1079990000312720.

DESBOROUGH, J. P. (2000): The stress response to trauma and surgery. *Br. J. Anaesth.* 85, 109–117. doi: 10.1093/bja/85.1.109.

DE WITTE, J. L., D. I. SESSLER (2002): Perioperative shivering: Physiology and pharmacology. *Anesthesiol.* 96, 467–484. doi: 10.1097/00000542-200202000-00036.

ECKERSALL, P. D., S. DUTHIE, S. SAFI, D. MOFFATT, N. U. HORADAGODA, S. DOYLE, R. PARTON, D. BENNETT, J. L. FITZPATRICK (1999): An Automated Biochemical Assay for Haptoglobin: Prevention of Interference from Albumin. *Comp. Haematol. Int.* 9, 117–124. doi.org/10.1007/BF02600369.

ECKERSALL, P. D., F. P. LAWSON, L. BENCE, M. M. WATERSTON, T. L. LANG, W. DONACHIE, M. C. FONTAINE (2007): Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet. Res.* 3, 35. doi: 10.1186/1746-6148-3-35.

ECKERSALL, P. D., R. BELL (2010): Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine, *Vet. J.* 185 23–30. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009.

ENHÖRNING, S., T. J. WANG, P. M. NILSSON, P. ALMGREN, B. HEDBLAD, G. BERGLUND, J. STRUCK, N. G. MORGENTHALER, A. BERGMANN, E. LINDHOLM, L. GROOP, V. LYSENKO, M. ORHO-MELANDER, C. NEWTON-CHEH, O. MELANDER (2010): Plasma copeptin and the risk of diabetes mellitus. *Circulation*. 18, 2102-2108. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909663.

EL-DEEB, W. M., M. THARWAT (2015): Lipoproteins profile, acute phase proteins, proinflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in sheep with pneumonic pasteurellosis, *Comp. Clin. Path.* 24, 581–588. doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101352.

EL GHMATI, S. M., E. M. VAN HOEYVELD, J. G. VAN STRIJP, J. L. CEUPPENS, E. A. STEVENS (1996): Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11B/CD18. *J. Immunol.* 156, 2542–2552. PMID: 8786317.

EVERS, K. S., S. WELLMANN (2018): Arginine Vasopressin and Copeptin in Perinatology. *Front. Pediatr.* 2, 4:75. doi: 10.3389/fped.2016.00075.

EXTON, J. H. (1979): Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr. Endocrinol.* 12, 535-546. doi: 10.1007/978-3-642-81265-1_28.

FENSKE, W., S. STÖRK, A. BLECHSCHMIDT, S. G. K. MAIER, N. G. MORGENTHALER, B. ALLOLIO (2009): Copeptin in the differential diagnosis of hyponatremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 123-129. doi: 10.1210/jc.2008-1426.

FENSKE, W. K., I. SCHNYDER, G. KOCH, C. WALTI, M. PFISTER, P. KOPP, M. FASSNACHT, K. STRAUSS, AND M. CHRIST-CRAIN (2018): Release and Decay Kinetics of Copeptin vs AVP in Response to Osmotic Alterations in Healthy Volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1, 505-513. doi: 10.1210/jc.2017-01891.

FRANCHI, S., G. MOSCHETTI, G. AMODEO, P. SACERDOTE (2019): Do All Opioid Drugs Share the Same Immunomodulatory Properties? A Review from Animal and Human Studies. *Front. Immunol.* 12, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2019.02914.

GABAY, C., I. KUSHNER (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N. Engl. J. Med.* 340, 448–454. doi: 10.1056/NEJM199902113400607.

GALON, J., D. FRANCHIMONT, N. HIROI, G. FREY, A. BOETTNER, M. EHRHART-BORNSTEIN, J. J. O'SHEA, G. P. CHROUSOS, S. R. BORNSTEIN (2002): Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *Faseb. J.* 16, 61–71. doi: 10.1096/fj.01-0245com.

GANHEIM, C. C., U. HULTEN, H. CARLSSON, R. NISKANEN, K. P. WALLER (2003): The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J. Vet. Med. B.* 50, 183–190. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00658.x.

GARRIDO, M. J., I. F. TROCÓNIZ (1999): Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *Pharmacol. Toxicol. Methods.* 42, 61–66. doi:10.1016/s1056-8719(00)00043-5.

GOMEZ-MARTINEZ, M. I., O. VARELA-LOPEZ, J. L. FONTALBA-NAVAS, A. GONZÁLEZ-CANTALAPIEDRA (2020): Effects of fentanyl on intraocular pressure and pupil size in medetomidine-methadone premedicated dogs: a pilot study. *Vet. Rec. Open.* 7, e000391. doi.org/10.1136/vetreco-2019-000391.

GONZALEZ, A. A., S. NAS-PARRA, F. CIFUENTES-ARANEDA, C. REYES-MARTINEZ (2020): Chapter Eight - Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease. *Vitamins and Hormones*, Volume 113, Pages 217-238.

GONZÁLEZ, F. H., F. TECLES, S. MARTINEZ-SUBIELA, A. TVARIJONAVICIUTE, L. SOLER, J. J. CERÓN (2008): Acute phase protein response in goats. *J. Vet. Diagn. Investig.* 20, 580–584. doi: 10.1177/104063870802000507.

GRUYS, E., M. J. M. TOUSSAINT, W. J. M LANDMAN, M. TIVAPASI, R. CHAMANZA, L. VAN VEEN (1999): Infection, Inflammation and Stress Inhibit Growth. Mechanisms and Non-specific Assessment of the Processes by Acute Phase Proteins. In: Wensing, T. (Ed.), *Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference*, 1998. Wageningen Press, Wageningen, p.72-87. ISBN:90-74134-60-2.

GRUYS, E., M. J. M. TOUSSAINT, T. A. NIEWOLD, S. J. KOOPMANS (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang. Univ. Sci.* 6, 1045–1056. doi: 10.1631/jzus.2005.B1045.

HAKAMATA, Y., S. KOMI, Y. MORIGUCHI, S. IZAWA, Y. MOTOMURA, E. SATO, S. MIZUKAMI, Y. KIM, T. HANAKAWA, Y. INOUE, H. TAGAYA (2017): Amygdala-centred functional connectivity affects daily cortisol concentrations: a putative link with anxiety. *Sci. Rep.* 16, 8313. doi: 10.1038/s41598-017-08918-7.

HAN, J. H., J. Y. KWAK, S. S. LEE, H. G. KIM, H. JEON, R. R. CHA (2023): Markedly elevated aspartate aminotransferase from non-hepatic causes. *J. Clin. Med.* 12, 310. doi.org/10.3390/jcm12010310.

HANNIBAL, K. E., M. D. BISHOP (2014): Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. *Phys. Ther.* 17, 1816–1825. doi: 10.2522/ptj.20130597.

HAROUTOUNIAN S. (2018): Postoperative opioids, endocrine changes, and immunosuppression. *Pain. Rep.* 3, e640. doi:10.1097/PR9.0000000000000640.

HELANDER, E. M., M. P. WEBB, B. MENARD, A. PRABHAKAR, J. HELMSTETTER, E. M. CORNETT, R. D. URMAN, V. H. NGUYEN, A. D. KAYE (2019): Metabolic and the surgical

stress response considerations to improve postoperative recovery. *Curr. Pain. Headache. Rep.* 23, 33. doi: 10.1007/s11916-019-0770-4.

HERMAN, J. P., J. M. MCKLVEEN, M. B. SOLOMON, E. CARVALHO-NETTO, B. Myers (2012): Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 292–298. doi: 10.1590/s0100-879x2012007500041.

HILLHOUSE, E. W., D. K. GRAMMATOPOULOS (2006): The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: Implications for physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 27, 260–286. doi: 10.1210/er.2005-0034.

HMZA, A., F. ALASHKHAM, A. AMMR, A. ASHOUR, S. A. ALTWAYR (2024): Immediate effects of anesthesia agents on liver function. *Alq. J. Med. App. Sci.* 7, 88-93. doi.org/10.54361/ajmas.2472213.

HUANG, M., J. C. WATSO, L. N. BELVAL, F. A. CIMINO, M. FISCHER, C. P. JARRARD, J. M. HENDRIX, C. HINOJOSA LABORDE, C. G. CRANDALL (2021): Low-dose fentanyl does not alter muscle sympathetic nerve activity, blood pressure, or tolerance during progressive central hypovolemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 322, R55–R63. doi.org/10.1152/ajpregu.00217.2021.

INAGI, T., H. HOSHINA, M. SUZUKI, M. WADA, H. BITO, A. SAKAMOTO (2016): Remifentanyl-induced alterations in neutrophil numbers after surgery. *J. A. Clin. Rep.* 2, 5. doi.org/10.1186/s40981-016-0031-z.

IVASCU R., L. I. TORSIN, L. HOSTIUC, C. NITIPIR, D. CORNECI, M. DUTU (2024): The surgical stress response and anesthesia: a narrative review. *J. Clin. Med.* 13, 3017. doi:10.3390/jcm13103017.

IWASAKI, M., M. EDMONDSON, A. SAKAMOTO, D. MA (2015): Anaesthesia, surgical stress, and “long-term” outcomes. *Acta. Anaesthesiol. Taiwan.* 53, 99–104. doi: 10.1016/j.aat.2015.07.002.

JAIN, S., V. GAUTAM, S. NASEEM (2011): Acute-phase proteins: A diagnostic tool. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3, 118–127. doi: 10.4103/0975-7406.76489.

JALLEH, R., D. J. TORPY (2021): The Emerging Role of Copeptin. *Clin. Biochem. Rev.* 42, 17-25. doi: 10.33176/AACB-20-00001.

KABIR, K., A. MALVIYA, M. BHARANG, A. SHARMA, G. TYAGI, M. BANJARE (2025): A prospective clinical study to assess the hemodynamic changes and safety of 0.5% levobupivacaine hyperbaric for spinal anaesthesia in adult patients. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 17, S360–S362. doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_32_25.

KADMIEL, M., J. A. CIDLOWSKI (2013): Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 34, 518-530. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003

KAFAMI, L., I. ETESAMI, M. FEFELI, N. ENAYATI, R. GHIAGHI, A. AMINIAN, A. DEHPUR (2013): Methadone diminishes neuroinflammation and disease severity in EAE through modulating T cell function. *J. Neuroimmunol.* 15, 9-44. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.10.015.

KATAN, M., M. CHRIST-CRAIN (2010): The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness. *Swiss. Med. Wkly.* 24, 13101. doi: 10.4414/smw.2010.13101.

KATAN M., F. FLURI, N. G. MORGENTHALER, P. SCHUETZ, C. ZWEIFEL, R. BINGISSER, K. MÜLLER, S. MECKEL, A. GASS, L. KAPPOS, A. J. STECK, S. T. ENGELTER, B. MÜLLER, M. CHRIST-CRAIN (2009): Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann. Neurol.* 66, 799–808. doi: 10.1002/ana.21783.

KATO, G. (2009) Haptoglobin halts haemoglobin's havoc. *J. Clin. Invest.* 119, 2140–2142. doi: 10.1172/JCI40258.

KE, C., N. TIAN, X. ZHANG, M. CHEN (2020): Changes in perioperative hemoglobin and hematocrit in patients undergoing total knee arthroplasty: a prospective observational study of optimal timing of measurement. *J. Int. Med. Res.* 48. doi:10.1177/0300060520969303.

- KHALIL, R. H., N. AL-HUMADI (2020): Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (Review). *Biomed. Rep.* 12, 143–152. doi: 10.3892/br.2020.1276.
- KIM, W. H., H. S. JIN, J. S. KO, T. S. HAHM, S. M. LEE, H. S. CHO, M. H. KIM (2011): The effect of anesthetic techniques on neutrophil-to-lymphocyte ratio after laparoscopy-assisted vaginal hysterectomy. *Acta. Anaesthesiol. Taiwan.* 49, 83–87. doi.org/10.1016/j.aat.2011.08.004.
- KOO, C. Y., M. EIKERMANN (2011): Respiratory effects of opioids in perioperative medicine. *Open. Anesthesiol. J.* 5, 23–34. doi:10.2174/1874321801105010023.
- KUSHNER I., A. MACKIEWICZ (1987): Acute phase proteins as disease markers, *Dis. Markers.* 5 1–11. PMID: 2458880
- KUO, T., A. MCQUEEN, T. C. CHEN, J. C. WANG (2015): Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 872:99-126. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_5.
- LACOUMENTA, S., T. H. YEO, J. M. BURRIN, S. R. BLOOM, J. L. PATERSON, G. M. HALL (1987): Fentanyl and the b eta-endorphin, ACTH and glucoregulatory hormonal response to surgery. *Br. J. Anaesth.* 59, 713-20. doi: 10.1093/bja/59.6.713.
- LAM, S., H. LIU, Z. JIAN, J. SETTELS, C. BOHRINGER (2021): Intraoperative invasive blood pressure monitoring and the potential pitfalls of invasively measured systolic blood pressure. *Cureus.* 13, e17610. doi.org/10.7759/cureus.17610.
- LANNERGARD, A., A. LARSSON, P. KRAGSBJERG, G. FRIMAN (2003): Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand J Clin Lab Invest.* 63:267–272. doi.org/10.1080/00365510310001636.
- LEE, M., S. M. SILVERMAN, H. HANSEN, V. B. PATEL, L. A. MANCHIKANTI (2011): A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain. Physician.* 14, 145–161.
- LECLERE, M. (2017): Corticosteroids and immune suppressive therapies in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine. Practice.* 33(1):17-27. doi: 10.1016/j.cveq.2016.11.008.

LEE, D. Y., E. KIM, M. H. CHOI (2015): Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep.* 48, 209-216. doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.275.

LEWIS, J. G., C. J. BAGLEY, P. A. ELDER, A. W. BACHMANN, D. J. TORPY (2005): Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin. Chim. Acta.* 359, 189-194. doi: 10.1016/j.cccn.2005.03.044.

LIN E. J., S. PROST, H. J. LIN, S. SHAH, R. LI (2025): Combined General/Epidural Anesthesia vs. General Anesthesia on Postoperative Cytokines: A Review and Meta-Analysis. *Cancers.* 15, 1667. doi: 10.3390/cancers17101667.

LUMLEY, M. A., J. L. COHEN, G. S. BORSZCZ, A. CANO, A. M. RADCLIFFE, L. S. PORTER, H. SCHUBINER, F. J. KEEFE (2011): Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. *J. Clin. Psychol.* 67:942–968. doi: 10.1002/jclp.20816.

ŁUKASZYK, E., J. MAŁYSZKO (2015): Copeptin: Pathophysiology and potential clinical impact. *Adv. Med. Sci.* 60, 335-341. doi: 10.1016/j.advms.2015.07.002.

LYKKEGAARD K, B. LAURITZEN, L. TESSEM, P. WEIKOP, O. SVENDSEN (2005): Local anaesthetics attenuate spinal nociception and HPA-axis activation during experimental laparotomy in pigs. *Res. Vet. Sci.* 79, 245-251. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.11.017.

MACKIEWICZ A., I. KUSHNER, H. BAUMANN (1993): Acute phase proteins molecular biology, biochemistry, and clinical applications, CRC Press, Boca Raton.

MARIK, P. E., R. BELLOMO (2013): Stress hyperglycemia: an essential survival response! *Crit. Care.* 6, 305. doi: 10.1186/cc12514.

MILLER, D. B., J. P. O'CALLAGHAN (2002): Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 51, 5–10. doi: 10.1053/meta.2002.33184.

MIRANI TORADEH B., I. JAVADI, F. ADABIYEH (2020): Evaluation of the effect of methadone on liver toxicity by examining the liver enzymes (ALP, ALT, AST) and Bilirubin total and Bilirubin direct. *J. Adv. Pharm. Edu. Res.* 10 (S1): 106–112.

MONTELLANO, F., A., K. UNGETHÜM, L. RAMIRO, A. NACU, S. HELLWIG, F. FLURI, W. N. WHITELEY, A. BUSTAMANTE, J. MONTANER, U. P. HEUSCHMANN (2021): Role of Blood-Based Biomarkers in Ischemic Stroke Prognosis: A Systematic. Review. *Stroke.* 52, 543-551. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.029232.

MORGENTHALER N. G., J. STRUCK, C. ALONSO, A. BERGMANN (2006): Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin. Chem.* 52, 112–119. doi: 10.1373/clinchem.2005.060038.

MORIMATSU, M., B. SYUTO, N. SHIMADA, T. FUJINAGA, S. YAMAMOTO, M. SAITO, M. NAIKI (1991): Isolation and characterisation of bovine haptoglobin from acute phase sera. *J. Biol. Chem.* 266:11833–7. PMID: 1904872

MRAZOVA, M., P. RAUSER, J. BUROVA, M. GEORGIU, T. FICHTEL (2018): Influence of medetomidine, acepromazine, fentanyl and butorphanol on intraocular pressure and pupil size in healthy dogs. *Vet. Med.* 63, 413–419. doi.org/10.17221/51/2018.

MURATA, H., N. SHIMADA, M. YOSHIOKA (2004): Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28–40. doi: 10.1016/S1090-0233(03)00119-9.

NAGAPPA, M., T. N. WEINGARTEN, G. MONTANDON, J. SPRUNG, F. CHUNG (2017): Opioids, respiratory depression, and sleep-disordered breathing. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 31, 469-485. doi: 10.1016/j.bpa.2017.05.004.

NEDEL, W. L., A. T. VASCONCELLOS, K. A. GUNSCH, P. H. R. SOARES (2022): Accuracy and precision of oscillometric noninvasive blood pressure measurement in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Anaesthesiol. Intensive. Ther.* 54, 425–431. doi.org/10.5114/ait.2022.123120.

NINNEMANN, A., K. HOCK, S. LUPPUS, N. SCHERBAUM, C. TEMME, J. BUER, A. M. WESTENDORF, W. HANSEN (2024): Direct effects of heroin and methadone on T cell function. *Int. Immunopharmacol.* 25:140:112736. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112736.

NICOLAIDES, N., Z. GALATA, T. KINO, G. CHROUSOS, E. CHARMANDARI (2010): The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids.* 75, 1-12. doi: 10.1016/j.steroids.2009.09.002

OAKLEY, R. H., J. A. CIDLOWSKI (2013): The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 132, 1033-1044. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007.

OZMEN, C., O. S. DEVECI, O. TEPE, C. YESILDAS, I. ÜNAL, I. YILDIZ, R. E. AKILLI, A. DENIZ, M. DEMIR, M. KANADAŞI and A. USAL (2021): Prognostic performance of copeptin among patients with acute decompensated heart failure. *Acta. Cardiol.* 76, 842-851. doi: 10.1080/00015385.2020.1786624.

PAOLA, A., L. CARLO, D. R. CINZIA (2015): Stress response to surgery, anaesthetics role and impact on cognition. *J. Anesth. Clin. Res.* 6, 1–5. doi: 10.4172/2155-6148.1000539.

PAVLICA, M., M. KRŽAN, A. NEMEC, T. KOSJEK, A. BAŠ, A. SELIŠKAR (2022): The pharmacokinetics of levobupivacaine 0.5% after infraorbital or inferior alveolar block in anesthetized dogs. *Front. Vet. Sci.* 9, 1055231. doi: 10.3389/fvets.2022.1055231.

PERSEC J, Z. PERSEC, I. HUSEDZINOVIC (2009): Postoperative pain and systemic inflammatory stress response after preoperative analgesia with clonidine or levobupivacaine: a randomized controlled trial. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 558-563. doi:10.1007/s00508-009-1221-8.

PETERSEN, H. H., J. P. NIELSEN, P. M. H. HEEGAARD (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163–187. doi: 10.1051/vetres:2004002.

PETERSEN, N.H., S. ORTEGA-GUTIERREZ, A. RECCIUS, A. MASURKAR, A. HUANG, R. S. MARSHALL (2014): Comparison of non-invasive and invasive arterial blood pressure measurement for assessment of dynamic cerebral autoregulation. *Neurocrit. Care.* 20, 60–68. doi.org/10.1007/s12028-013-9898-y.

PHILIPPIDIS, P., J. C. MASON, B. J. EVANS, I. NADRA, K. M. TAYLOR, D. O. HASKARD, R. C. LANDIS (2004): Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis — antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* 94, 119–126. doi: 10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9.

POLONOVSKI, M., M. F. JAYLE (1938): Existence dans le plasma sanguine d'une substance activant l'action peroxidasique de l'hémoglobine. *C. R. Soc. Biol.* 129, 457. doi: 10.12691/ajmr-4-2-3.

PSARIANOS A. E., A. PHILIPPOU, A. PAPADOPETRAKI, E. CHATZINIKITA, C. CHRYSSANTHOPOULOS, A. THEOS, A. THEOCHARIS, C. TZAVARA, T. PAPARRIGOPOULOS (2025): Cortisol and β -Endorphin responses during a two-month exercise training program in patients with an opioid use disorder and on a substitution treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 5178. doi:10.3390/ijms26115178.

QURAISHI, R., P. KATHIRESAN, K. VERMA, R. RAO, R. JAIN (2022): Effect of chronic opioid use on the hematological and inflammatory markers: A retrospective study from North India. *Indian. J. Psychiatry.* 64, 252 – 256. doi: 10.4103/indianjpsychiatry.indianjpsychiatry_751_21.

RAMAMOORTHY, S., J. A. CIDLOWSKI (2016): Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 42, 15-31. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002.

RAMOS-TOVAR, E., P. MURIEL (2020): Molecular mechanisms that link oxidative stress, inflammation, and fibrosis in the liver. *Antioxidants*. 9, 1279. doi.org/10.3390/antiox9121279.

RANGAPRIYA, A., R. VENKATRAMAN, M. KARTHIK, A. PREETHI (2023): A comparison of the effects of epidural levobupivacaine and morphine for postoperative analgesia following major abdominal surgery: a randomized controlled trial. *Cureus*. 15, e34900. doi: 10.7759/cureus.34900.

RAYNES, J. D. (1994): The acute phase response. *Biochemical Society Transactions*, 22, 69–74. doi: 10.1042/bst0220069.

REM, J., M. R. BRANDT, H. KEHLET (1980): Prevention of postoperative lymphopenia and granulocytosis by epidural analgesia. *Lancet*. 1, 283–284. doi.org/10.1016/s0140-6736(80)90780-1.

RIVIER, C., W. VALE (1983): Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature*. 305:325-327. doi: 10.1038/305325a0.

ROTHER, R.P., L. BELL, P. HILLMEN, M. T. GLADWIN (2005): The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin — a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 293, 1653–1662. doi: 10.1001/jama.293.13.1653.

SACERDOTE, P., B. MANFREDI, P. MANTEGAZZA, A. E. PANERAI (1997): Antinociceptive and immunosuppressive effects of opioids: a structure-related activity study. *Br. J. Pharmacol*. 121, 834–840. doi: 10.1038/sj.bjp.0701138.

SAGHIR, Z., J. N. SYEDA, A. S. MUHAMMAD, T. H. BALLA ABDALLA (2018): The Amygdala, Sleep Debt, Sleep Deprivation, and the Emotion of Anger: A Possible Connection? *Cureus*. 02, e2912. doi: 10.7759/cureus.2912.

SAĞLIK, Y., D. YAZICIOĞLU, O. ÇİÇEKLER, H. GÜMÜŞ (2015): Investigation of Effects of Epidural Anaesthesia Combined with General Anaesthesia on the Stress Response in Patients

Undergoing Hip and Knee Arthroplasty. Turk. J. Anaesthesiol. Reanim. 16, 154–161. doi: 10.5152/TJAR.2015.26818.

SAPOLSKY, R. M., L. M. ROMERO, A. U. MUNCK (2000): How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr. Rev. 21, 55-89.

SCHAER, D. J., F. S. ROBERTI, G. SCHOEDON, A. SCHAFFNER (2002): Induction of the CD163- dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. Br. J. Haematol. 119, 239–243.

SCHAER, C. A., G. SCHOEDON, A. IMHOF, M. O. KURRER, D. J. SCHAER (2006): Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. Circ. Res. 99, 943–50. doi: 10.1161/01.RES.0000247067.34173.1b.

SCHROEDL, W., B. FUERLL, P. REINHOLD, M. KRUEGER, C. SCHUETT (2001): A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). J. Endotoxin. Res. 7, 49–52. doi: 10.1179/096805101101532530.

SMITH, D. J., D. ROBERTS (1994): Effects of high volume and/or intense exercise on selected blood chemistry parameters. Clin. Biochem. 27, 435–440. doi: 10.1016/0009-9120(94)00055-z.

SMITH, S. M., W. W. VALE (2006): The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues Clin. Neurosci. 8, 383–395. doi: 10.31887/DCNS.2006.8.4/ssmith.

TAHERGORABI, Z., H. RAHMANI, J. WILLIAMS, M. MOODI (2019): The effect of methadone on blood glucose, lipids and glucose-modulating hormones in methadone-dependent Wistar rats. Toxicol. Res. 36, 221–226. doi: 10.1007/s43188-019-00019-z.

TAN, M., F. F. XU, J. S. PENG, D. M. LI, L. H. CHEN, B. J. LV, Z. X. ZHAO, C. HUANG, C. X. ZHENG (2003): Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World. J. Gastroenterol.* 9, 364–367. doi: 10.3748/wjg.v9.i2.364.

THOMPSON, D. R. (2001) Narcotic analgesic effects on the sphincter of Oddi: a review of the data and therapeutic implications in treating pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1266-1272. doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03536.x.

TOUSSAINT, M. J. M. (2000): Acute phase protein in different species measured as a tool to assess animal health. *Eur. Colloq. Rep.* 1, 1–3.

ULRICH-LAI, Y. M., J. P. HERMAN (2009): Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397-409. doi: 10.1038/nrn2647.

UZUNLAR, Ö., Ü. Y. SERT, N. KADIOĞLU, T. ÇANDAR, Y. E. ÜSTÜN (2021): The effects of water immersion and epidural analgesia on cellular immune response, neuroendocrine, and oxidative markers. *Turk. J. Med. Sci.* 51, 1420-1427. doi: 10.3906/sag-2009-181.

VAN GASTEL, M. D. A., E. MEIJER, L. E. SCHEVEN, J. STRUCK, S. J. L. BAKKER, R. T. GANSEVOORT (2015): Modifiable Factors Associated with Copeptin Concentration: A General Population Cohort. *American Journal of Kidney Diseases.* Volume 65, Issue 5, 719-727. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.10.009.

VON RECUM J, J. SEARLE, A. SLAGMAN, J. O. VOLLERT, M. ENDRES, M. MÖCKEL, M. EBINGER (2015): Copeptin: Limited Usefulness in Early Stroke Differentiation? *Stroke. Res. Treat.* 2015:768401. doi: 10.1155/2015/768401.

YANG, F., D. J. HAILE, F. G. BERGER, D. C. HERBERT, E. VAN BEVEREN, A. J. GHIO (2003): Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, 402–409. doi: 10.1152/ajplung.00115.2002.

YANG J, J. LI, G. XU, J. ZHANG, Z. CHEN, Z. LU, H. DENG (2016): Elevated hair cortisol levels among heroin addicts on current methadone maintenance compared to controls. PLoS. ONE. 11, e0150729. doi:10.1371/journal.pone.0150729.

YERBURY, J. J., M. S. RYBCHYN, S. B. EASTERBROOK-SMITH, C. HENRIQUES, M. R. WILSON (2005): The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. Biochem. 44, 10914–25. doi: 10.1021/bi050764x.

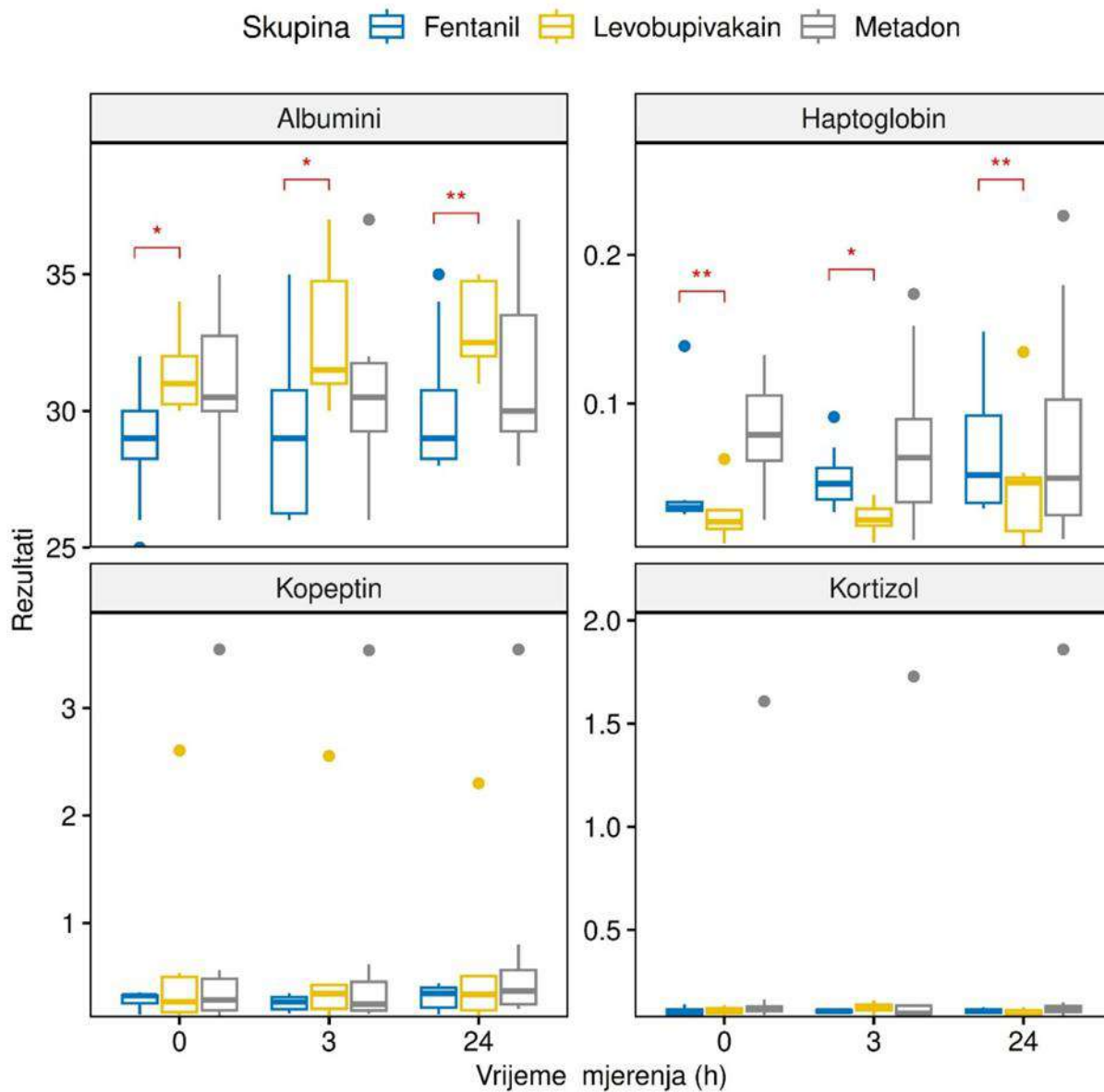
YILMAZ, D., S. YILDIZ, M. ÇETIN (2010): Effect of anaesthetic agents administered to the mothers on transcutaneous bilirubin levels in the neonates. Acta. Paediatr. 99, 993-996. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01761.x.

WATT D.G., P. G. HORGAN, D. C. MCMILLAN (2015): Routine clinical markers of the magnitude of the systemic inflammatory response after elective operation: a systematic review. Surg. 157:362–380. doi: 10.1016/j.surg.2014.09.009.

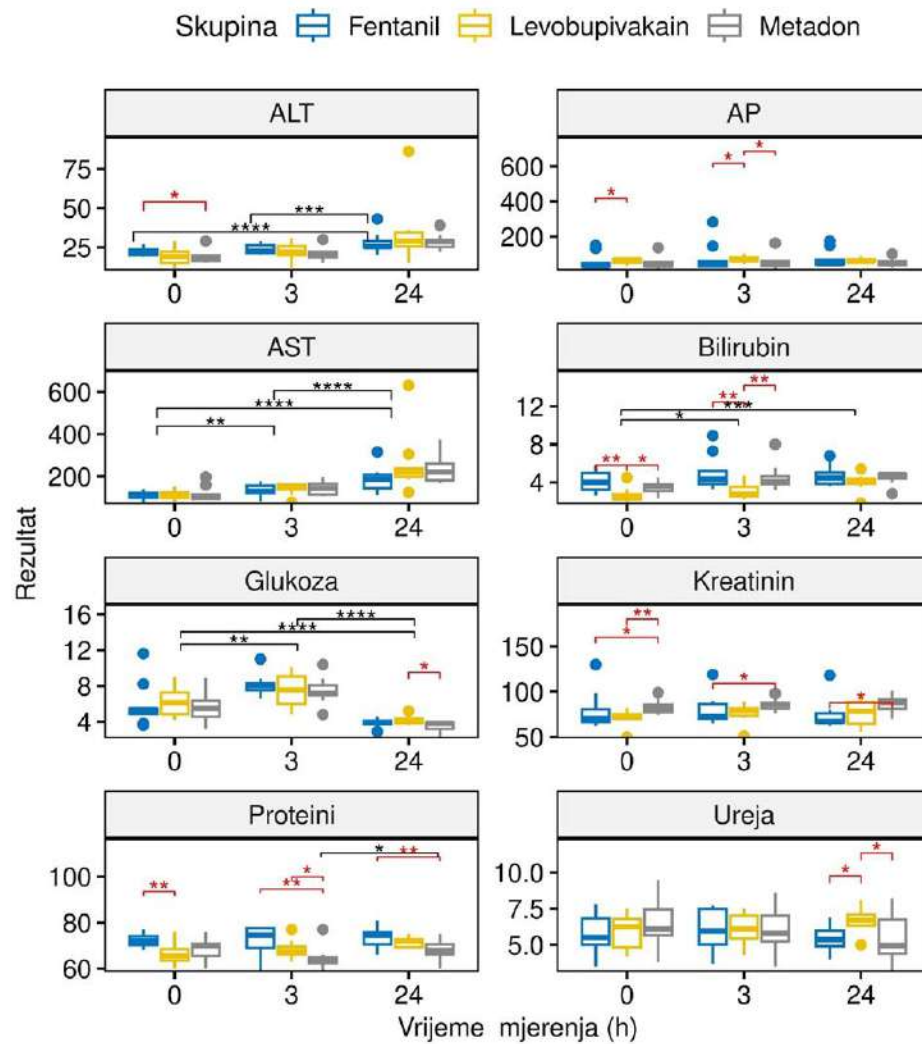
WU, S.D., Z. H. ZHANG, J. Z. JIN, J. KONG, W. WANG, Q. ZHANG, D. Y. LI, M. F. WANG (2004): Effects of narcotic analgesic drugs on human Oddi's sphincter motility. World. J. Gastroenterol. 10, 2901-2904. doi.org/10.3748/wjg.v10.i19.2901.

ZOJAJIF., A. KHALESİ, A. BAHRAMI, S. A. EBRAHIMI, M. GANJIFARD (2023): Evaluation of serum cortisol levels and response to cosyntropin test in methadone-treated opium addicts. Anesth. Pain. Med. 13, 135206. doi.org/10.5812/aapm-135206.

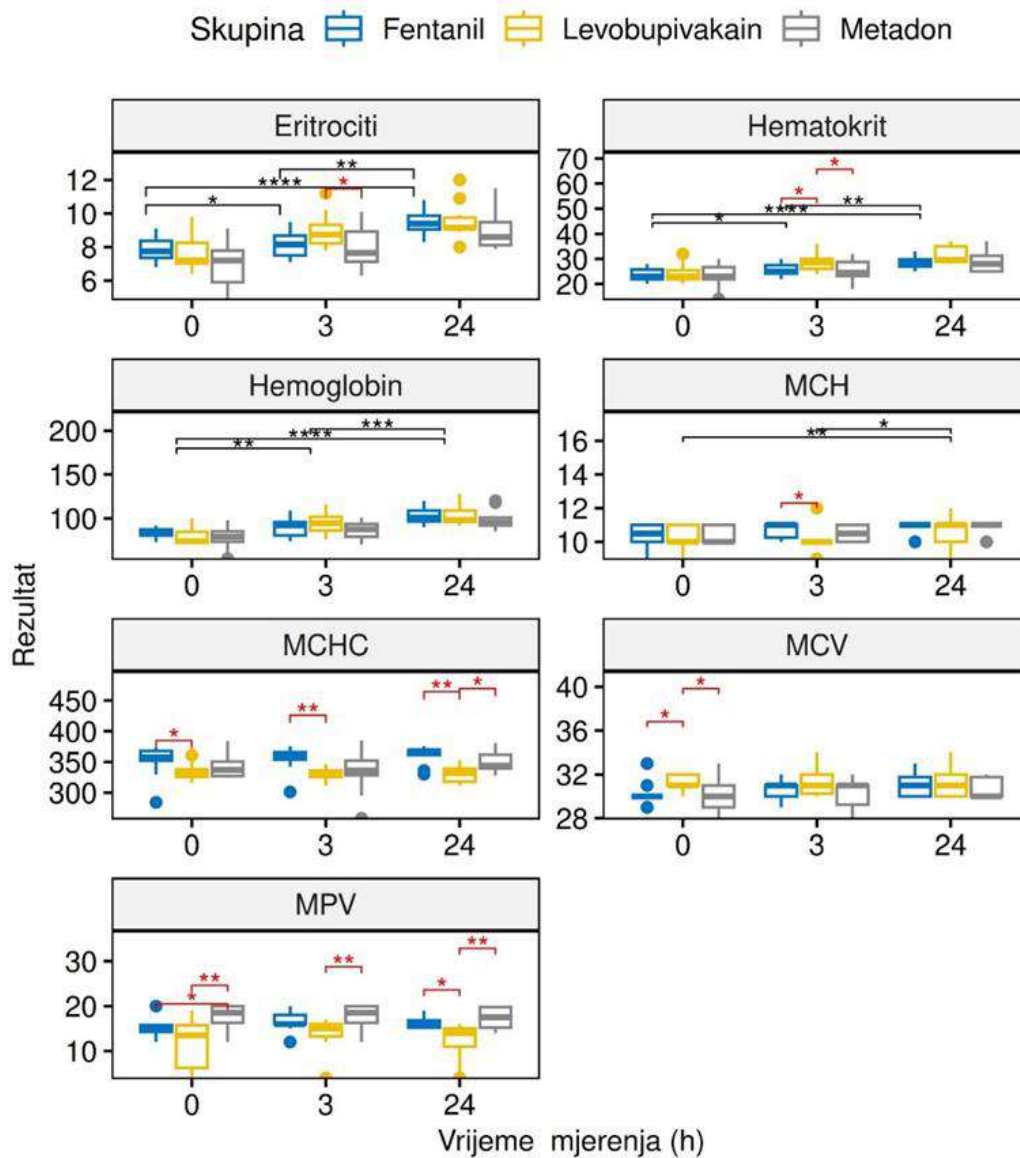
9. PRILOG A



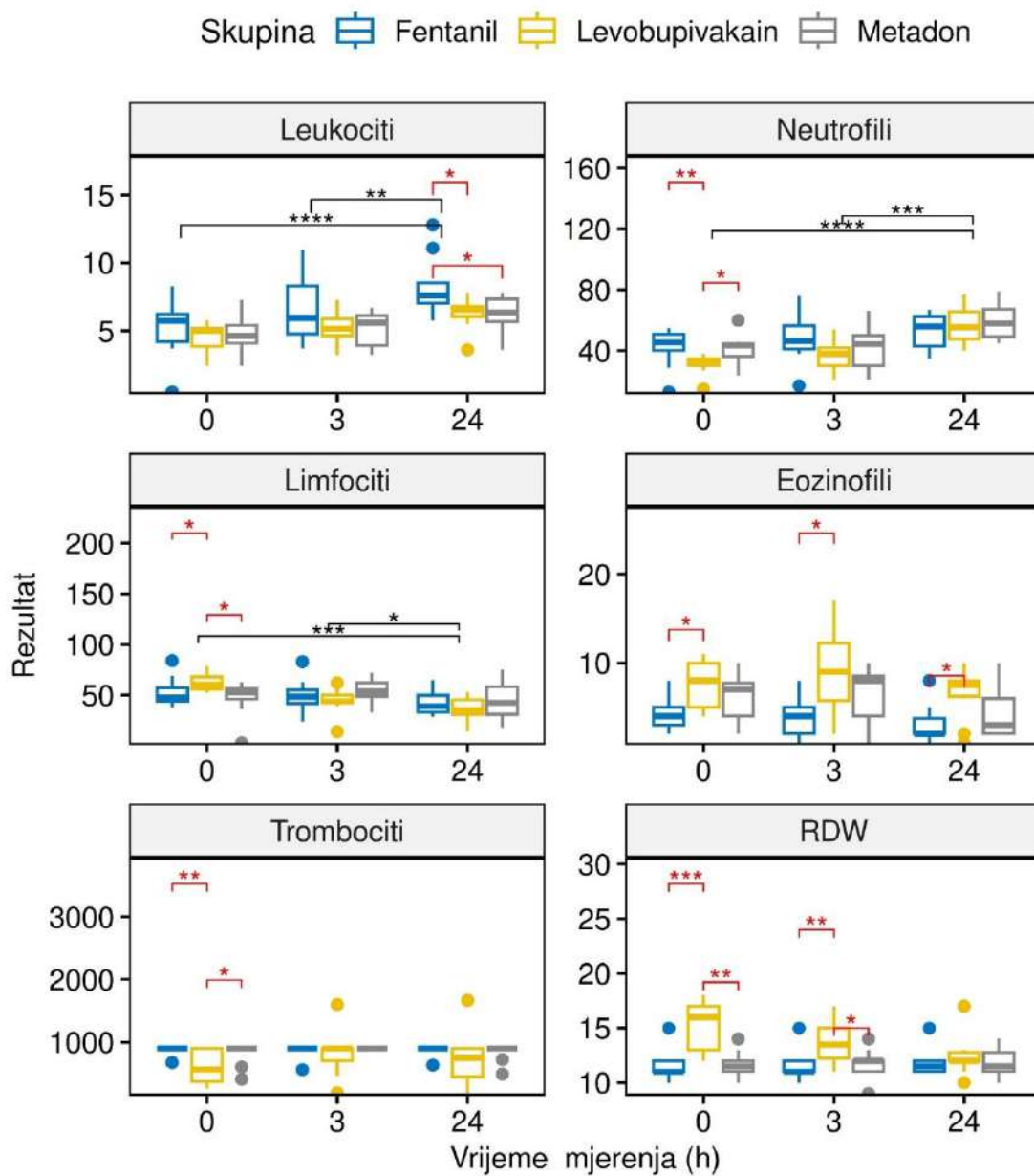
Slika A1: Prikaz bioloških pokazatelja stresa tijekom perioperacijskog razdoblja unutar tri vremenske točke između tri skupine. Crvene linije i asterisk (*) označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina unutar vremenske točke.



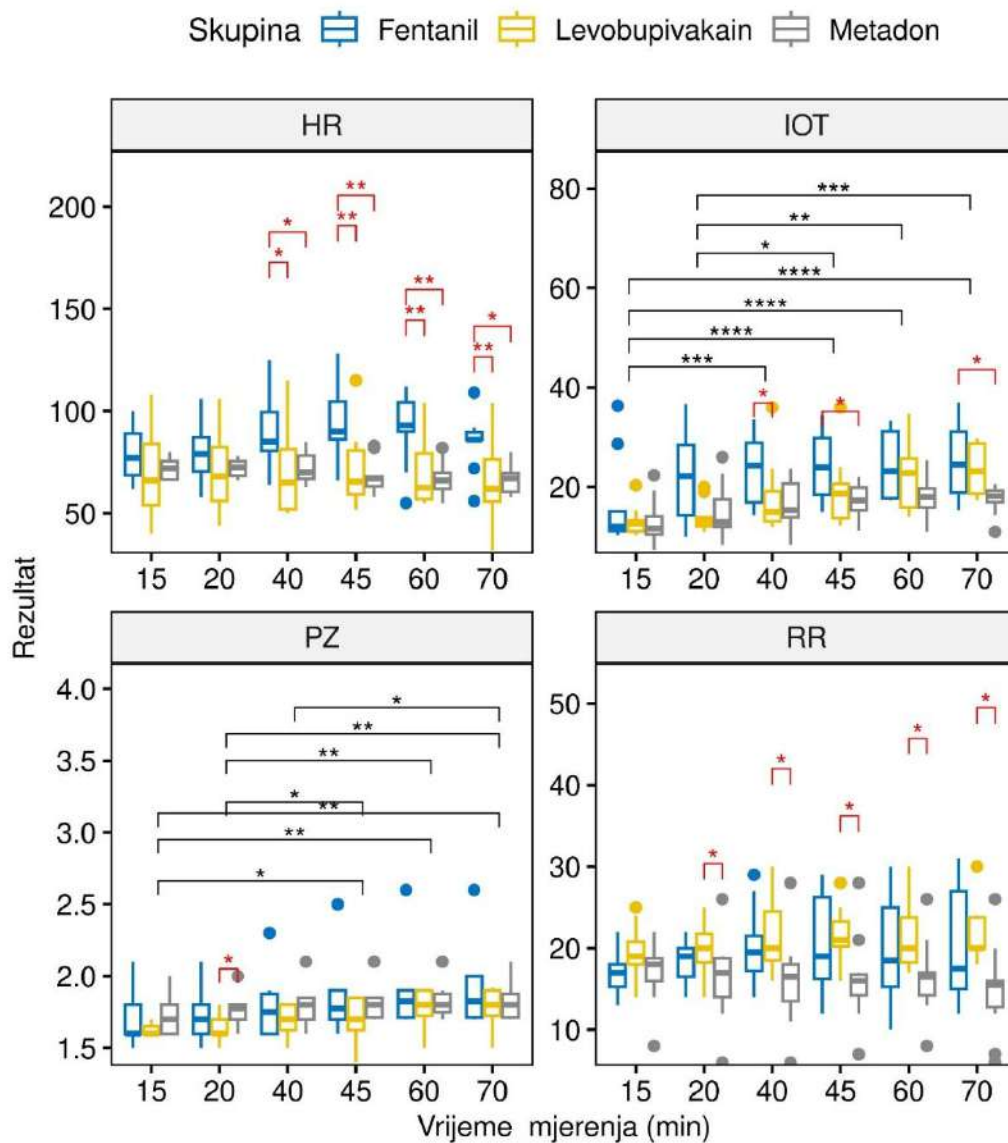
Slika A2: Prikaz biokemijskih pokazatelja tijekom perioperacijskog perioda unutar tri vremenske točke i između tri skupine. Crvena linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između skupina unutar vremenske točke dok crna linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku skupina između vremenskih točaka.



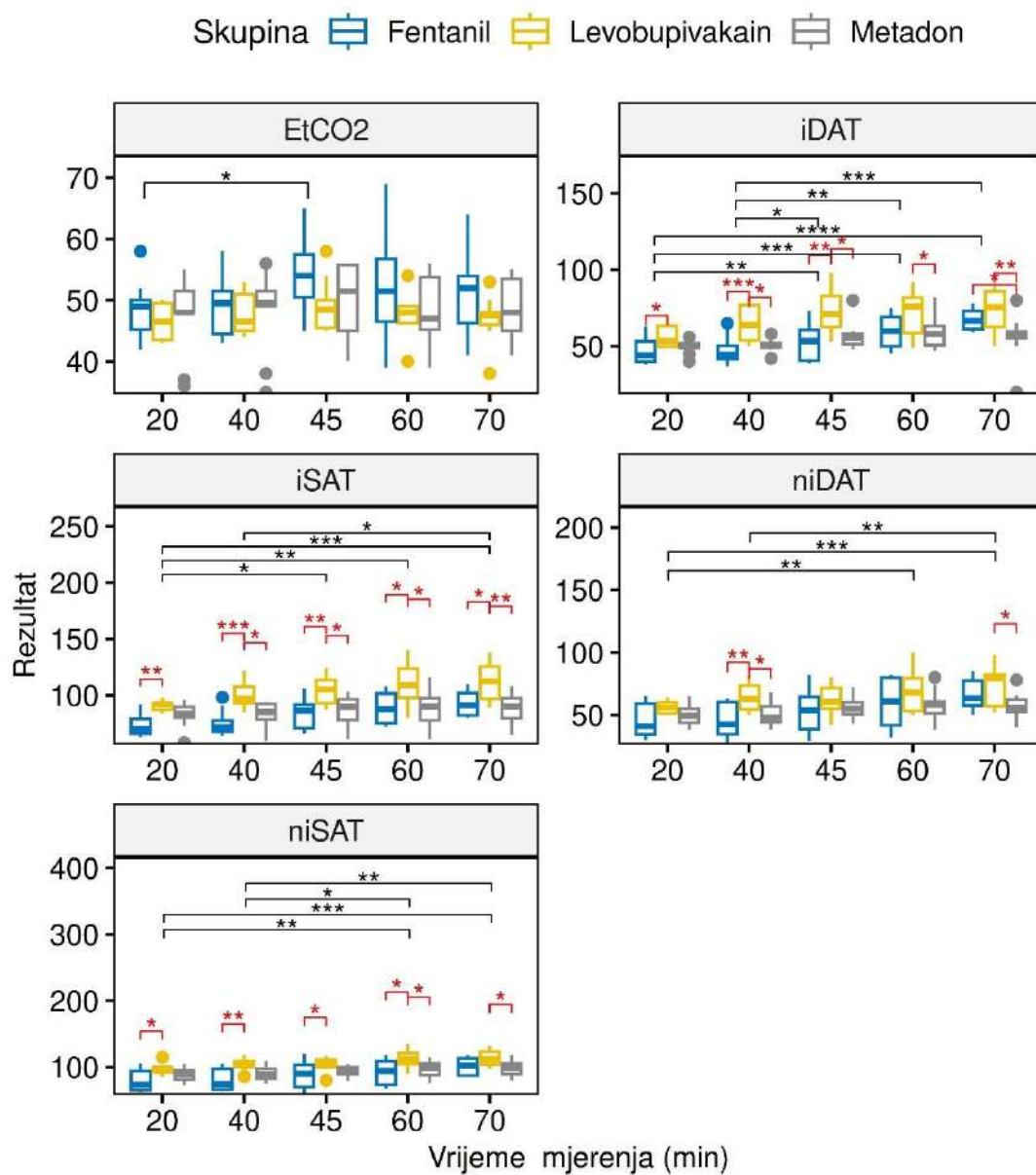
Slika A3. Prikaz hematoloških pokazatelja tijekom perioperacijskog perioda unutar tri vremenske točke i između tri skupine. Crvene linije i asterisk (*) označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina unutar vremenske točke dok crna linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku skupina između vremenskih točaka.



Slika A4. Prikaz hematoloških pokazatelja tijekom perioperacijskog perioda unutar tri vremenske točke i između tri skupine. Crvene linije i asterisk (*) označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina unutar vremenske točke dok crna linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku skupina između vremenskih točaka.



Slika A5. Prikaz srčane frekvencije, respiracijske frekvencije, intraokularnog tlaka i promjera zjenice mjerenih u šest vremenskih točaka unutar tri skupine tijekom perioperacijskog perioda. Crvene linije i asterisk (*) označavaju statistički značajne razlike između skupina unutar vremenske točke dok crna linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku skupina između vremenskih točaka.



Slika A6. Prikaz hemodinamskih promjena mjerenih tijekom perioperacijskog perioda unutar šest vremenskih točaka između tri skupine. Crvene linije i asterisk (*) označavaju statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina unutar vremenske točke dok crna linija i asterisk (*) označavaju statistički značajnu razliku skupina između vremenskih točaka

10. ŽIVOTOPIS AUTORICE S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA

Mirta Vučković rođena je u Slavonskom Brodu 28. kolovoza 1989. godine. Srednju školu, Gimnaziju Matija Mesić, završila je 2008. godine, kada je upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2015. godine, a tijekom studija aktivno je volontirala na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju te sudjelovala u laboratorijskim i terenskim istraživanjima morskih sisavaca na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju te Zavodu za biologiju. Osim toga, stjecala je iskustvo kroz terenski volonterski rad na farmama mliječnih krava i rad kao demonstrator na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju.

Tijekom studija bila je nagrađena dvjema Dekanovim nagradama za znanstveni studentski rad – za istraživanja u području procjene broja dobrog dupina u šibensko-kninskoj županiji i određivanja fetalnih estrogena u mokraći gravidnih magarica.

Odmah po završetku studija, 2015. godine, zapošljava se kao doktor veterinarske medicine u ZOE CONSULT d.o.o., a ubrzo potom, od prosinca 2015. do listopada 2019. godine, radi kao stručni suradnik i doktorand na europskom projektu HORIZON 2020 BIO-CHIP 681103, fokusiranom na predklinička istraživanja u području veterinarske medicine na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Nakon završetka projekta, 2019. godine zapošljava se kao stručni suradnik – anesteziolog u istoj klinici, a od siječnja 2020. godine radi kao asistent u području veterinarske kliničke znanosti s posebnim fokusom na veterinarsku stomatologiju, u kojem kontinuirano usavršava svoje znanje sudjelujući na brojnim tečajevima, kongresima i međunarodnim radionicama.

Mirta Vučković aktivno sudjeluje u organizaciji znanstvenih simpozija i edukativnih radionica, uključujući i vođenje radionica iz područja veterinarske stomatologije i anestezije. Tijekom svoje karijere kombinirala je klinički rad, znanstveno istraživanje i edukaciju, ističući se kao stručnjakinja u veterinarskoj medicini s posebnim doprinosom u području stomatologije i kirurških postupaka.

Projekti

- **2025. – danas:** Istraživač na EU projektu „*LUMINATE*“, Horizon 2020
- **2015. – 2019.:** Istraživač na EU projektu, *Bioengineered Grafts for Cartilage Healing in Patients*“ (BIO-CHIP, Horizon 2020)

Nagrade

- **2011:** Dekanova nagrada za znanstveni studentski rad „Procjena broja dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) u šibensko-kninskoj županiji“
- **2012:** Dekanova nagrada za znanstveni studentski rad „Mogućnosti određivanja fetalnih estrogena u mokraći gravidnih magarica (*Equus asinus*) u svrhu neinvazivnog praćenja razvoja ploda“

Članstva

- Član Hrvatske veterinarske komore (HVK)

Predavanja na međunarodnim i nacionalnim konferencijama

- Pozvano predavanje, 7. Hrvatski veterinarski kongres, Dubrovnik, Hrvatska, listopad 2024. – Resorpcija zuba kod mačaka i pasa, liječenje prijeloma zuba i zadržanih korijena, parodontalne bolesti
- Gostujući predavač, studentski projekt „Hitna i intenzivna skrb“, srpanj 2024. – Stomatološke hitne intervencije
- Pozvano predavanje, WSAVA Symposium, Zagreb, 2018 – *Oral disease are painful*
- Pozvano predavanje, Veterinarski dani, Opatija, 2017 – *Multimodalni pristup s primjerima iz prakse*

Organizacija i vođenje radionica / tečajeva

- 7.10.2023: Voditelj radionice „Praktična veterinarska stomatologija“, 10th International Congress „Veterinary Science and Profession 2023“, Zagreb
- 12.10.2019: Voditelj radionice „Basics of canine dentistry“, 8th International Congress „Veterinary Science and Profession 2019“, Zagreb
- 16.6.2018: Voditelj radionice „Veterinary basic and local anesthesia workshop“, 2nd European Veterinary Students Seminar, Zagreb

Organizacijski odbori međunarodnih simpozija

- 12th YGVA meeting in Zagreb 17-19th of July 2024
- 27.6.2018: 3rd International Veterinary Specialties Symposium – Emergency and Critical Care in Veterinary Medicine, Zagreb
- 27.6.2017: 2nd International Veterinary Specialties Symposium – Emergency treatments in Small Animals, Zagreb
- 30.6.2016: 1st International Veterinary Specialties Symposium – New Insights into Small Animal Cancer Treatment, Zagreb

Stipendije

- CEEPUS stipendija, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Equine Clinic, Brno, Češka, rujan 2014
- Erasmus stipendija, Klinika za male životinje, Veterinarski fakultet Ljubljana, Slovenija, 16.2.2025. – 4.3.2025.

Usavršavanja i međunarodni boravci

- Dermatološke patologije i uloga veterinarskih dijeta u terapiji, Zaštita od vanjskih i unutrašnjih parazita pasa i mačaka, 2015, Zagreb (Hrvatska)
- 3rd International Conference on Regenerative Orthopaedics and Tissue Engineering, 2015, Zagreb (Hrvatska)

- 1st International Veterinary Specialties Symposium, New Insights into Small Animal Cancer Treatment, 2016, Zagreb, Croatia
- Dentistry and Oral Surgery course, 2016, Zagreb (Hrvatska)
- Precongress dentistry day - workshop, 2017, Ljubljana (Slovenia)
- 2nd International Veterinary Specialties Symposium, Emergency treatments in Small Animals, 2017, Zagreb, (Hrvatska)
- 7th International Congress "Veterinary Science and Profession 2017", Zagreb (Hrvatska)
- 2nd European Veterinary Students Seminar, 2018, Zagreb, (Hrvatska)
- Precongress dentistry day - dental radiography, 2018, Ljubljana (Slovenia)
- 3rd International Veterinary Specialties Symposium, Emergency and Critical Care in Veterinary Medicine, 2018, Zagreb (Hrvatska)
- 8th International Congress "Veterinary Science and Profession 2019", Zagreb (Hrvatska)
- 9th International Congress "Veterinary Science and Profession 2021", Zagreb (Hrvatska)
- 10th International Congress "Veterinary Science and Profession 2023", Zagreb (Hrvatska)
- 29° Congresso Internazionale SIVE, Firenze, 2-3 febbraio 2024
- 12th YGVA meeting in Zagreb 17-19th of July 2024
- 7th Eastern European Regional Veterinary Conference (EERVC), Beograd, Srbija, 2024
- ESAVS tečaj „Dentistry I“, Dublin, Irska, 8.3.2025 – 12.3.2025

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima citiranim u bazama podataka CC i SCI

1. CAPAK, H., B. ŠKRLIN, A. JAVOR, I. FOLNOŽIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, Z. VRBANAC (2024):
The incidence and distribution of radiographic changes in digital region of stud bulls without lameness. Veterinarski arhiv 94, 1–10. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.2045>
2. KOSTEŠIĆ, P., A. VUKASOVIĆ BARIŠIĆ, I. ERJAVEC, M. PUŠIĆ, D. HUDETZ, D. MATIČIĆ, D. VNUK, **M. VUČKOVIĆ**, A. IVKOVIĆ (2022): Characterisation of subchondral bone repair following transplantation of bioreactor-manufactured autologous osteochondral graft in a sheep model. European Cells and Materials 43, 79–97. <https://doi.org/10.22203/eCM.v043a08>
3. ŠEĆEROVIĆ, A., M. PUŠIĆ, P. KOSTEŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, R. VUKOJEVIĆ, S. ŠKOKIĆ, B. SASI, A. VUKASOVIĆ BARIŠIĆ, D. HUDETZ, D. VNUK, D. MATIČIĆ, I. URLIĆ, M. MUMME, I. MARTIN, A. IVKOVIĆ (2021): Nasal chondrocyte-based engineered grafts for the repair of articular cartilage “kissing” lesions: a pilot large-animal study. American Journal of Sports Medicine 49, 2187–2198. <https://doi.org/10.1177/03635465211014190>
4. PUŠIĆ, M., M. BREZAK, A. VUKASOVIĆ BARIŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, A. ŠEĆEROVIĆ, D. MATIČIĆ, A. IVKOVIĆ, I. URLIĆ (2021): Morphological and molecular evaluation of the tissue repair following nasal septum biopsy in a sheep model. Cartilage 13, 521–529. <https://doi.org/10.1177/19476035211046040>
5. GRGUREVIĆ, L., I. ERJAVEC, M. GUPTA, M. PEĆIN, T. BORDUKALO-NIKŠIĆ, N. ŠTOKOVIĆ, D. VNUK, V. FARKAŠ, H. CAPAK, M. MILOŠEVIĆ, J. BUBIĆ ŠPOLJAR, M. PERIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, D. MATIČIĆ, R. WINDHAGER, H. OPPERMAN, T. KUBER SAMPATH, S. VUKIČEVIĆ (2020): Autologous blood coagulum containing rhBMP6 induces new bone formation to promote anterior lumbar interbody fusion (ALIF) and posterolateral lumbar fusion (PLF) of spine in sheep. Bone 138, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115448>
6. BRKLJAČA BOTTEGARRO, N., A. GUDAN KURILJ, J. GOTIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, H. CAPAK, Z. VRBANAC (2019): Fracture of the lesser tubercle of the humerus in a colt – a case report. Veterinarski arhiv 89, 425–434. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0142>

7. MUSULIN, A., M. ŠKULAC, **M. VUČKOVIĆ**, A. MARTINOVIĆ, P. KOSTEŠIĆ, N. BRKLJAČA BOTTEGARRO, M. PEĆIN, D. VNUK (2018): Effects of diazepam/ketamine and xylazine/ketamine sedation in geese. *Veterinarski arhiv* 88, 835–846. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0262>
8. SMOLEC, O., I. VLADIMIR, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, N. BRKLJAČA BOTTEGARRO, M. PEĆIN, M. KRESZINGER, E. OSTER, T. KOSTANJŠAK, J. KOS (2018): Osteoarthritis u pasa. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 26, 37–46.
9. **SELETKOVIĆ, M.**, K. ŠLOGAR, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ (2012): Procjena broja dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) u Šibensko-kninskoj županiji. *Veterinar: časopis studenata veterinarske medicine Zagreb* 50, 11–21.

Stručni radovi

1. CIGLAR, L., V. BUTKOVIĆ, P. DMITROVIĆ, A. SMAJLOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, B. ŠKRLIN, N. BRKLJAČA BOTTEGARRO, H. CAPAK (2019): Prostrijelna ruptura mozgovnih ovojnica u psa – prikaz slučaja. *Veterinarska stanica* 3, 273–278.
2. MUSULIN, A., A. MARTINOVIĆ, V. PLICHTA, **M. VUČKOVIĆ**, D. VNUK (2019): Strano tijelo u jednjaku pasa. *Veterinarska stanica* 50, 167–173.

Sažeci s međunarodnih i domaćih znanstvenostručnih skupova

1. **VUČKOVIĆ, M.** (2024): Periodontalne bolesti. Pozvano predavanje. Zbornik radova međunarodnog znanstveno stručnog skupa 7. Hrvatski veterinarski kongres, 24.-27. listopada 2024., Dubrovnik, Hrvatska, str. 91.
2. **VUČKOVIĆ, M.** (2024): Resorpcija zuba kod mačaka i pasa. Pozvano predavanje. Zbornik radova međunarodnog znanstveno stručnog skupa 7. Hrvatski veterinarski kongres, 24.-27. listopada 2024., Dubrovnik, Hrvatska, str. 93.
3. **VUČKOVIĆ, M.** (2024): Liječenje prijeloma zuba izaostalog korijena zuba. Pozvano predavanje. Zbornik radova međunarodnog znanstveno stručnog skupa 7. Hrvatski veterinarski kongres, 24.-27. listopada 2024., Dubrovnik, Hrvatska, str. 94.
4. ĆURIĆ, P., M. MAMIĆ, N. IVKIĆ, K. MILJAK, **M. VUČKOVIĆ** (2023): Ophthalmological disorders related to an oral squamous cell carcinoma in a North African hedgehog (*Atelerix algirus*) – a case report. *Book of Abstracts of 10th International*

Congress Veterinary Science and Profession, 5.–6. listopada 2023., Zagreb, Hrvatska, str. 121.

5. **VUČKOVIĆ, M.** (2023): Copeptin, new indicator of stress response. Book of Abstracts of 10th International Congress Veterinary Science and Profession, 5.–6. listopada 2023., Zagreb, Hrvatska, str. 160.
6. SMAJLOVIĆ, A., **M. VUČKOVIĆ**, P. DMITROVIĆ, B. PETRIČEVIĆ, I. ŠMIT, D. VNUK (2023): Development and treatment of pyothorax after esophagostomy tube placement in a dog. Book of Abstracts of the 20th EVECC Congress, 1.–3. lipnja 2023., Porto, Portugal, str. 152.
7. **VUČKOVIĆ, M.**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, H. CAPAK, Z. ŠTRITOF, M. HOHŠTETER, G. CSIK, T. BOSANAC, N. BRKLJAČA BOTTEGARO (2021): Osteosarcoma of the mandible in a geriatric horse – a case report. Book of Abstracts of 9th International Congress Veterinary Science and Profession, 7.–8. listopada 2021., Zagreb, Hrvatska, str. 60.
8. ŠEĆEROVIĆ, A., B. SASI, M. PUŠIĆ, P. KOSTEŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, D. VNUK, D. MATIČIĆ, I. MARIJANOVIĆ, M. MUMME, I. MARTIN i sur. (2019): Nasal chondrocyte-engineered implants: a functional treatment for severe articular cartilage lesions? Abstracts – ORS 2019 Annual Meeting, Austin, SAD, str. 1332.
9. PUŠIĆ, M., M. BREZAK, A. VUKASOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, D. MATIČIĆ, D. VNUK, A. ŠEĆEROVIĆ, A. IVKOVIĆ, I. MARIJANOVIĆ (2019): Characterization of newly-formed tissue after nasal septum cartilage biopsy. Proceedings of the 3rd Cellfit Annual Meeting, Atena, Grčka, str. 66.
10. SMAJLOVIĆ, A., J. GOTIĆ, Z. ŠTRITOF, A. GUDAN KURILJ, **M. VUČKOVIĆ**, N. BRKLJAČA BOTTEGARO (2019): Clostridial myositis in mare following equine influenza and tetanus vaccination – a case report. Book of Abstracts of 8th International Congress Veterinary Science and Profession, 4.–5. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 162.
11. VUKELIĆ, S., **M. VUČKOVIĆ**, A. MUSULIN, D. CAPAK, P. KOSTEŠIĆ, V. PLICHTA, D. MATIČIĆ, D. VNUK (2019): Comparison of two different suturing (closing) techniques after partial lung lobectomy on ovine model – ex vivo study. Book of

Abstracts of 8th International Congress Veterinary Science and Profession, 4.–5. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 114.

12. VUKELIĆ, S., **M. VUČKOVIĆ**, D. MATIČIĆ, H. CAPAK, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, D. VNUK (2019): Surgical treatment of periodontitis in dogs – a retrospective study. Book of Abstracts of 8th International Congress Veterinary Science and Profession, 4.–5. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 147.
13. KOSTEŠIĆ, P., **M. VUČKOVIĆ**, A. SMAJLOVIĆ, T. KOSTANJŠEK, F. KAJIN, J. BORAS, I. BATA, H. CAPAK, B. PIRKIĆ (2019): Minimally invasive fracture repair of comminuted tibial fracture in ring-tailed lemur. Book of Abstracts of 8th International Congress Veterinary Science and Profession, 4.–5. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 126.
14. **VUČKOVIĆ, M.**, P. KOSTEŠIĆ, S. VUKELIĆ, N. IVKIĆ, I. ŠMIT, J. BORAS, I. BATA, H. CAPAK, D. MATIČIĆ (2019): Dental treatment in three red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*) – a case series. Book of Abstracts of 8th International Congress Veterinary Science and Profession, 4.–5. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 127.
15. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, L., M. LIPAR, K. MARTINKOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, A. GUDAN KURILJ, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, Ž. GRABAREVIĆ, B. ARTUKOVIĆ, K. SEVERIN, D. HUBER, I. MIHOKOVIĆ et al. (2019): Immunohistochemical expression of $\beta 1$ integrin in canine cutaneous melanocytic tumors. Final Program and Book of Abstracts of the 27th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology with One Health Session, 13.–15. lipnja 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 41.
16. PUŠIĆ, M., A. VUKASOVIĆ, A. MEŠTROVIĆ, I. MARIJANOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, D. MATIČIĆ, D. VNUK, A. ŠEĆEROVIĆ, B. SASI et al. (2018): 3D tissue engineered cartilage grafts for the repair of patellofemoral osteochondral kissing lesions. Proceedings of Cellfit Meeting 2018, Zagreb, Hrvatska, str. 64.
17. PUŠIĆ, M., I. MARIJANOVIĆ, S. ŠKOKIĆ, D. HORAK, S. GAJOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, D. MATIČIĆ, D. VNUK, A. IVKOVIĆ (2018): Iron oxide nanoparticles as a tool for MRI tracking of nasal chondrocytes. Abstracts – 5th TERMIS World Congress, 4.–7. rujna 2018., Kyoto, Japan, str. 636.

18. MARIJANOVIĆ, I., M. PUŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, P. KOSTEŠIĆ, D. MATIČIĆ, D. VNUK, A. VUKASOVIĆ, A. ŠEĆEROVIĆ, B. SASI, A. IVKOVIĆ (2018): Molecular and histological characterization of nasal chondrocyte-based cartilage grafts for the treatment of kissing lesions in the knee. Abstracts – 5th TERMIS World Congress, 4.–7. rujna 2018., Kyoto, Japan, str. 573.
19. DMITROVIĆ, P., A. MARTINOVIĆ, **M. VUČKOVIĆ** (2018): Veterinary basic local and regional anesthesia workshop. Book of Abstracts of 2nd European Veterinary Students Seminar, 18.–20. svibnja 2018., Zagreb, Hrvatska, str. 37–41.
20. DMITROVIĆ, P., H. CAPAK, **M. VUČKOVIĆ**, M. STEJSKAL (2018): Surgical management of a femur fracture in an Inland Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*) – a case report. Zbornik radova 1. znanstveno-stručnog skupa o gmazovima "Reptilia", 22.–23. rujna 2018., Zagreb, Hrvatska, str. 124.
21. KOSTEŠIĆ, P., M. MAMIĆ, J. BORAS, I. BATA, M. LUKAČ, **M. VUČKOVIĆ**, D. VNUK, Z. VRBANAC, D. MATIČIĆ (2017): Orchiectomy of the lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in field conditions. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 115.
22. **VUČKOVIĆ, M.**, A. PETAK, N. LEMO, I. JOVIĆ, P. KOSTEŠIĆ, D. MATIČIĆ, A. GUDAN KURILJ (2017): Chronic ulcerative stomatitis in Maltese dog – a case report. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 139.
23. MARTINOVIĆ, A., A. MUSULIN, P. KOSTEŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, J. BORAS, D. MATIČIĆ (2017): Anaesthetic management of unilateral adrenalectomy in an Eastern quoll (*Dasyurus viverrinus*) – case report. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 78.
24. GRDEN, D., **M. VUČKOVIĆ**, J. GOTIĆ, N. BRKLJAČA BOTTEGARO (2017): Nonsurgical removal of uroliths in horse. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 97.
25. TOPLIČANEC, I., D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN, G. NEDELJKOVIĆ, P. KOSTEŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, J. BORAS, I. BATA, M. LUKAČ (2017): Monitoring health status in a group of captive nutrias (*Myocastor coypus*). Book of Abstracts of 7th

International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 121.

26. **VUČKOVIĆ, M.**, P. KOSTEŠIĆ, J. BORAS, H. CAPAK, I. ŠMIT, O. SMOLEC, A. MARTINOVIĆ, D. MATIČIĆ (2017): Total oral/dental treatment in a serval (*Leptailurus serval*) – case report. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 122.
27. PUŠIĆ, M., A. VUKASOVIĆ, P. KOSTEŠIĆ, **M. VUČKOVIĆ**, D. VNUK, D. MATIČIĆ, D. HUDETZ, I. MARIJANOVIĆ, A. ŠEĆEROVIĆ, A. IVKOVIĆ (2017): Characterization of nasal septum chondrocytes in comparison to articular chondrocytes. Book of Abstracts of 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 6.–7. listopada 2017., Zagreb, Hrvatska, str. 116.
28. SAKAČ, M., S. HORVAT, **M. SELETKOVIĆ**, K. ŠLOGAR, T. GOMERČIĆ, M. ĐURAS (2013): Ossification of flipper bones in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Abstract book: 27th Conference of the European Cetacean Society, 8.-10. travnja 2013., Setúbal: Escola de Mar, Portugal, str. 374-374.
29. HORVAT, S., M. SAKAČ, **M. SELETKOVIĆ**, K. ŠLOGAR, T. GOMERČIĆ, M. ĐURAS (2013): Ductus arteriosus and foramen ovale in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Abstract book: 27th Conference of the European Cetacean Society, 8.-10. travnja 2014., Setúbal: Escola de Mar, Portugal, str. 364-364.