



Promene u hematološkim i biohemijskim parametrima krvi pasa prilikom dugotrajne primene ivermektina u cilju lečenja bolesti srčanog crva

Sandra Nikolić^{a*}, Dragica Stojanović^a, Marko Cincović^a, Mira Majkić^a, Maja Došenović Marinković^a, Jovan Spasojević^a, Ivan Galić^a, Filip Štrbac^a, Dražen Kovačević^a

^aUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Srbija

*Autor za kontakt: neckovs021@gmail.com

SAŽETAK

Ivermektin je antiparazitski lek koji pripada familiji makrocikličnih laktona. Veoma je efikasan protiv endo- i ekto- parazita u niskim dozama, a u poslednje vreme se najčešće upotrebljava u prevenciji i lečenju bolesti srčanog crva. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi da li se prilikom dugotrajne primene ivermektina, u dozama od 10 µg/kg t.m., u lečenju pasa od srčanog crva javljaju promene u hematološkim i biohemijskim parametrima koje se mogu pripisati dejstvu leka. Studija je obuhvatala pse koji su primali ivermektin parenteralno na svake dve nedelje tokom šest meseci u terapiji srčanog crva. Krv je uzorkovana u momentu dijagnostikovanja bolesti kod psa, pre početka terapije, a zatim prilikom kontrolnog testiranja nakon završenih šest meseci terapije. Aplikacija ivermektina dva puta mesečno u dozi od 10 µg/kg t.m. u trajanju od šest meseci u cilju lečenja bolesti srčanog crva kod pasa dovodi do značajnog variranja pojedinih parametara posle terapije u odnosu na pre početka terapije. U hematološkom profilu ukupan broj limfocita i RDW pokazuju najveću varijabilnost koja se može pripisati dejstvu leka (53,33%). Zatim slede monociti (46,66%), hematokrit (40%), eritrociti i hemoglobin (33,33%), MCH i trombociti (26,66%) i na kraju leukociti, MCHC i neutrofilii (13,33%). U biohemijskom profilu, variranje koje se može pripisati leku se javilo kod 60% pasa za parametre kreatinin, AST, trigliceridi i kalcijum, 46,66% za fosfor, 40% za ALT, 33,33% za ureu, 26,66% za ukupne proteine, 20% za albumine i 13,33% za glukozu, bilirubin, ALP i holesterol. Dobijeni rezultati ukazuju da je potrebno kontrolisati životinje prilikom dugotrajne primene ivermektina, obavestiti vlasnike o efektima leka tokom dugotrajne primene, a takođe treba razmotriti i upotrebu suplemenata koji ublažavaju neželjene efekte leka.

Ključne reči: ivermektin, hematološki i biohemijski parametri, bolest srčanog crva, varijabilnost.

Uvod

Ivermektin je antiparazitski lek koji pripada familiji makrocikličnih laktona i koji predstavlja mešavinu dva hemijski modifikovana avermektina, sa zastupljenošću od najmanje 80% 22,23-dihidroavermektina - B1a i 20% ili nešto manje 22,23-dihidroavermektina - B1b (Canga i sar., 2009). Ove dve komponente avermektina su proizvod aktinomicete *Streptomyces avermitilis* (Hopper i sar., 2002). Ivermektin je prilično efikasan lek protiv endo i ekto parazita u veoma niskim dozama, veoma je aktivan protiv širokog spektra nematoda, uključujući i larvene i adultne forme, kao i protiv mnogih artropodnih parazita domaćih životinja (Mogalhaes i sar., 2016), a u poslednje vreme se najčešće upotrebljava u prevenciji i lečenju bolesti srčanog crva. U ove svrhe, ivermektin se koristi u dozi od 0,006-0,012 mg/kg t.m. kod pasa i 0,024 mg/kg t.m. kod mačaka. Može da se aplikuje i peroralno u rastvoru sa propilen glikolom, a može i parenteralno, supkutanom aplikacijom. Kao mikrofilarioid kod pasa se koristi u dozi od 0,05-0,2 mg/kg t.m., a u tretmanu ekto-parazita u dozi od 0,3-0,6 mg/kg t.m. (Merola i Eubig, 2016). Kao antihelmintik, može se aplikovati na različite načine, oralno ili supkutano, a istraživanja Panigrahi i sar. (2016) ukazuju na male razlike u efikasnosti ivermektina aplikovanog oralnim putem (96-100%) u odnosu na efikasnost ivermektina aplikovanog supkutano (90-100%).

Način delovanja ivermektina na nematode i artropode je da u nanomolarnim koncentracijama utiče na motilitet, ishranu i reprodukciju parazita delujući preko glutamat-zavisnih hloridnih kanala. Ovi kanali postoje samo kod beskičmenjaka i to na komisurama motornih neurona, lateralne i sublateralne nervne vrpce i faringealnih neurona, pa je efekat ivermektina na motilitet i ishranu parazita posledica vezivanja ivermektina za ove kanale na tim mestima. U novije vreme, prisustvo glutamat-zavisnih hloridnih kanala je ustanovljeno i u reproduktivnom traktu parazita, ali još uvek nije potvrđena njihova uloga u sterilitetu nematoda izazvanog ivermektinom (Laing i sar., 2017). Bezbednost ove grupe jedinjenja za sisare se zasniva na tome da sisari nemaju glutamat-zavisne hloridne kanale, da

makrociklični laktoni imaju slab afinitet za druge ligand-zavisne jonske kanale, kao i to da ne prodiru kroz krvno-moždanu barijeru sisara, izuzev kod nekih rasa pasa (Mogalhaes i sar., 2016). Primećeno je da su psi rasa koli i drugih ovčarskih rasa kao što su šetlandski ovčar, staroengleski ovčar, australijski ovčar, zatim mali engleski hrt, doberman pinčeri, kao i njihovi mešanci genetski osetljivi na ivermektin. Međutim, prijavljeni su slučajevi toksičnosti ivermektina i kod drugih rasa kao što su nemački ovčar i pomeranski špic (Islam i sar., 2017; Singh i sar., 2018).

Brojne studije opisuju razne kliničke simptome toksičnosti ivermektina kod pasa kao što su slepilo, midrijaza, depresija, hipersalivacija, ataksija, tremori, nemogućnost disanja, koma i smrt, a ovi simptomi predstavljaju posledicu pojačane neuronske inhibicije. Do ovoga dolazi jer receptori gama-aminobuterne kiseline, kao inhibitornog neurotransmitera, bivaju aktivirani od strane ivermektina, nakon čega izazivaju hiperpolarizaciju ćelijske membrane putem pojačane postsinaptičke permeabilnosti za hloridne jone (Epstein i Hollingsworth, 2013). Osim neuroloških ispada kao neželjenih efekata ivermektina, kod pasa su opisani i poremećaji hematoloških i biohemijskih parametara usled toksičnog delovanja ivermektina na organizam. U jednoj studiji kod štenadi dobermana utvrđene su promene u vrednosti serumske kreatinin fosfokinaze (CPK), gama glutamil transpeptidaze (GGT), laktat dehidrogenaze (LDH), ali i glukoze (Dey i sar., 2017). U drugoj studiji efikasnosti delovanja ivermektina aplikovanog na različite načine kod pasa uočene su promene u vrednosti hemoglobina (HGB), hematokrita (HCT), MCV, MCH, eozinofila (EOS) i limfocita (LYM), kao i alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), uree (BUN), ukupnih proteina, albumina (ALB), globulina (GLOB) i glukoze (GLU) (Panigrahi i sar., 2016). Kod pacova usled primene ivermektina takođe dolazi do promene u biohemijskim parametrima krvi kao što su jetrini enzimi, holesterol (CHOL) i trigliceridi (TGC) (Qureshi, 2013), a takođe je i kod ljudi opisan težak slučaj hepatitisa izazvanog aplikacijom ivermektina (Veit i sar., 2006).

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi da li se prilikom dugotrajne primene ivermektina, u terapijskim dozama, u lečenju pasa obolelih od srčanog crva javljaju promene u hematološkim i biohemijskim parametrima kod ispitivanih jedinki koje se mogu pripisati dejstvu leka.

Materijal i metode

U ovom istraživanju su korišćeni uzorci krvi od petnaest vlasničkih pasa, različite starosti, rase i pola, koji su dovedeni u ambulantu radi preventivnog testiranja na srčanog crva ili su testirani na osnovu postojanja kliničke sumnje na prisustvo bolesti. Kod svih pasa je sprovedena šestomesečna terapija. Korišćen je preparat Alfamec 1% (Alfasan International B. B. Kuipersweg 9, Woerden, Holandija, broj rešenja: 323-01-00271-14-001 od 19.01.2015). Psi su primali ivermektin na svake dve nedelje tokom šest meseci u terapiji srčanog crva dugotrajnom (tzv. *slow-kill*) metodom i koji nisu pripadali grupi ranije navedenih pasa sa genetskom osetljivošću na ivermektin. Krv je uzorkovana u momentu dijagnostikovanja bolesti srčanog crva kod psa, odnosno pri prvom pregledu i pre početka terapije. Sledeće uzorkovanje vršeno je pri prvom kontrolnom testiranju na antigen odraslog parazita šest meseci od početka terapije. Doza ivermektina koju su primali psi bila je 10 µg/kg telesne mase, a lek je aplikovan parenteralnim putem, supkutanom aplikacijom.

Uzorci krvi su kod svih pasa uzorkovani iz cefalične vene u vakutajneru sa EDTA kao antikoagulantom i u epruvetu za biohemijska ispitivanja krvi. Serum je odvojen od pune krvi unutar pola sata od dobijanja uzorka, centrifugiranjem na 4500 rpm tokom deset minuta. Krv je analizirana neposredno nakon uzorkovanja na spektrofotometru marke Rayto i hematološkom brojačku Nihon Kohden.

Prisustvo srčanog crva utvrđeno je pomoću brzog testa (*Immuno Run CD*), prilikom čega je na Slici 1 prikazan izgled pozitivnog testa na antigen odraslog parazita *Dirofilaria immitis*. Utvrđivanje prisustva mikrofilarija je vršeno pomoću mikroskopa marke *Olympus CX31*, pri uvećanju od 10x, tehnikom direktnog razmaza. Mikrofilarije utvrđene ovom tehnikom su prikazane na Slici 2.

Za analizu dobijenih rezultata je korišćena deskriptivna statistička analiza. Utvrđene su srednje vrednosti ispitivanih parametara pre i posle terapije i procenat pasa kod kojih su izmerene vrednosti bile ispod odnosno iznad referentnih RCV vrednosti za pse. Da bi se utvrdilo da li je davanje ivermektina uticalo na hematološke i biohemijske parametre, kod obolelih pasa ispitan je procenat odstupanja vrednosti parametara posle terapije u odnosu na pre terapije i utvrđeno je da li je to odstupanje biološka varijacija ili varijacija usled delovanja leka.



Slika 1. Pozitivni testovi na odraslog parazita *Dirofilaria Immitis* (orig.foto)

Figure 1. Positive tests for the adult parasite *Dirofilaria Immitis* (orig.photo)



Slika 2. Prisustvo mikrofilarije utvrđeno tehnikom direktnog razmaza (orig.foto)

Figure 2. Presence of microfilariae determined by direct smear technique (orig.photo)

Rezultati i diskusija

Aplikacija ivermektina dva puta mesečno u dozi od 10 µg/kg t.m. u trajanju od šest meseci u cilju lečenja bolesti srčanog crva kod pasa dovodi do značajnog variranja pojedinih parametara posle terapije u odnosu na pre početka terapije. Ukupan broj limfocita i RDW pokazuju najveću varijabilnost koja se može pripisati dejstvu leka (53,33%), zatim slede monociti (46,66%), hematokrit (40%), eritrociti i hemoglobin (33,33%), MCH i trombociti (26,66%) i na kraju leukociti, MCHC i limfociti (13,33%). Kada su u pitanju biohemijski parametri, variranje koje se može pripisati leku se javilo kod 60% pasa za parametre kreatinin, AST, trigliceridi i kalcijum, 46,66% za fosfor, 40% za ALT, 33,33% za ureu, 26,66% za ukupne proteine, 20% za albumine i 13,33% za glukozu, bilirubin, ALP i holesterol.

Dirofilaria immitis je nematodni parazit, uzročnik bolesti srčanog crva, čija je geografska distribucija povezana sa prisustvom intermedijarnog domaćina komarca koji je glavni prenosilac ovih parazita kod pasa. Parazit se nastanjuje u pulmonalnoj arteriji i desnoj pretkomori srca prijemčive životinje, gde izaziva oštećenja pulmonalne arterije i mehaničku opstrukciju krvotoka u desnoj komori u zavisnosti od broja prisutnih crva. Od promena u hematološkim parametrima kod bolesti srčanog crva mogu se javiti anemija, leukocitoza, periferna eozinofilija, bazofilija, pad koncentracije hemoglobina i trombocitopenija. U biohemijskim parametrima uočava se porast aktivnosti AST, ALT, porast koncentracije ukupnih proteina i uree, kao i bilirubina (BIL) (Lefkaditis i sar., 2008). Smatra se da anemija nastaje usled intravaskularne hemolize eritrocita zbog opstrukcije krvotoka velikim brojem parazita, kada se usled turbulencije mehanički oštećuju eritrociti (Atyha i Alani, 2017). Alergijske reakcije mogu uzrokovati perifernu eozinofiliju i bazofiliju (Lefkaditis i sar., 2008). Trombocitopenija se verovatno javlja kao imunološki posredovana, jer su utvrđena antitela koja se vezuju za trombocite kod pasa obolelih od srčanog crva (Cortese i sar., 2020). Porast aktivnosti ALT i AST predstavlja rezultat oštećenja ćelija i nekroze jetre usled povišenog portalnog pritiska, dok se za porast ALP smatra da je posledica naročito oštećenja žučnih kanala, dok se hiperbilirubinemija (ukupni i indirektni bilirubin) pripisuje hemolitičkoj anemiji ili oštećenju jetre delovanjem parazita ili filarija (Tabrizi, 2012). Porast koncentracije uree se javlja usled smanjene perfuzije bubrega, a porast koncentracije ukupnih proteina se javlja zbog porasta serumske frakcije globulina kod inficiranih jedinki (Lefkaditis i sar.,

2008; Atyha i Alani, 2017). Promene u koncentraciji kalcijuma i fosfora nisu utvrđene kod jedinki obolelih od srčanog crva u odnosu na zdrave (Tabrizi, 2012).

U našim ispitivanjima, u Tabelama 1. i 2. su prikazane prosečne vrednosti laboratorijskih nalaza i procenat životinja sa vrednostima hematoloških i biohemijskih parametara izvan referentnih vrednosti u momentu dijagnostikovanja oboljenja i posle završene terapije. Pri detekciji oboljenja, u odnosu na referentne vrednosti, u po jednom slučaju se javio porast vrednosti MCHC, trombocita, limfocita, eozinofila i monocita, a kod dva psa porast vrednosti eritrocita, MCH i RDW. Tri jedinke su imale porast koncentracije hemoglobina, a pet limfocita i MPV. U po jednom slučaju se javio pad u odnosu na referentne intervale kod eritrocita, hemoglobina, MCV, MCH, MCHC, MPV, kod dva psa pad broja leukocita, monocita i hematokrita, dok su kod tri psa zabeležene snižene vrednosti eozinofila i RDW, a kod pet jedinki pad trombocita i neutrofila. Ranjbar-Bahadori i sar. (2010) navodi da se kod pacijenata obolelih od srčanog crva javlja anemija zbog smanjenja broja eritrocita, pada koncentracije hemoglobina i PCV, kao i leukocitoza, a Lefkaditis i sar. (2008) ovim promenama dodaje eozinofiliju i bazofiliju za koju smatraju da su uzrokovane alergijskim reakcijama na prisustvo parazita. U našem istraživanju izostaju i anemija i leukocitoza sa neutrofilijom i eozinofilijom, što se ne poklapa sa nalazima ovih istraživača, a kao značajne promene javljaju se porast koncentracije hemoglobina, porast broja limfocita i porast MPV, smanjenje broja eozinofila, smanjenje RDW i izrazit pad broja trombocita i neutrofila. Od biohemijskih parametara prilikom detekcije oboljenja promene u parametrima u odnosu na referentni opseg su bile sledeće: porast uree i fosfora javio se kod po jednog psa, proteina, kreatinina i glukoze kod dva psa, ALP kod tri, porast kalcijuma je utvrđen kod četiri jedinke, AST kod pet, ALT i holesterola kod šest pasa, dok su globulini bili u porastu kod sedam pasa pri detekciji oboljenja, a bilirubin kod osam. Pad vrednosti biohemijskih parametara u odnosu na referentne vrednosti pri detekciji oboljenja javio se u po jednom slučaju za parametre ukupni proteini, albumini, globulini, bilirubin, ALT i kalcijum, a u dva slučaja za parametre urea, kreatinin i holesterol. Ovi nalazi se mogu pripisati delovanju parazita u organizmu obolele jedinke i u velikoj meri se poklapaju sa rezultatima dobijenim u istraživanju Lefkaditis i sar. (2008).

Usled toksičnog delovanja ivermektina na organizam javljaju se poremećaji hematoloških i biohemijskih parametara. Dey i sar. (2017) su utvrdili promene u vrednosti serumske CPK, GGT, LDH i GLU. U drugoj studiji uočene su promene u vrednosti HGB, HCT, MCV, MCH, EOS i LYM, kao i ALT, AST, BUN, ukupnih proteina, ALB, GLOB i GLU, nastale kao posledica delovanja ivermektina (5). Kod pacova usled primene ivermektina takođe dolazi do promene u biohemijskim parametrima krvi kao što su jetrini enzimi, CHOL i TGC (Qureshi, 2013). Kao najčešći nalaz u hematološkom profilu mikrofilarijemičnih pasa Niwetpathomwat i sar. (2007) utvrđuju blagu do umerenu anemiju, trombocitopeniju, izrazitu leukocitozu, umerenu do izrazitu neutrofiliju, eozinofiliju i monocitozu. Kao najčešće promene biohemijskih parametara-isti autori navode porast koncentracije ALP (311 ± 299), AST (50 ± 38 IU/L) i ALT (82 ± 76 IU/L). Kod koza koje su tretirane protiv šugarca, mesec dana nakon terapije ivermektinom utvrđen je porast HCT, HGB, broja eritrocita, ukupnih proteina, ALB, GLOB, BIL i GLU, a smanjenje broja leukocita u odnosu na momenat pre početka terapije (Habeeb, 2015).

U našim ispitivanjima, nakon terapije ivermektinom koja je trajala šest meseci sa dvonedeljnim razmakom između terapija i dozom od $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., bez pogoršanja toka bolesti i simptoma, zabeleženi su sledeći rezultati. U hematološkom profilu javio se porast u odnosu na referentni opseg leukocita, eritrocita, trombocita, limfocita, monocita, neutrofila i RDW kod po jednog psa, kod dva psa je uočen porast MCHC, kod tri psa porast vrednosti HCT i MPV, kod četiri MCH, a kod šest pasa je zabeleženo povećanje koncentracije HGB. Pad u odnosu na referentne intervale se javio kod po jednog psa za parametre eritrociti, HGB, HCT, MCHC i monociti, kod dva psa za parametre leukociti i trombociti, kod četiri psa je opala vrednost MPV, kod pet vrednost RDW, dok je kod sedam pasa je opao broj eozinofila. Zaključno, najupečatljivije promene u hematološkom profilu nakon terapije ivermektinom bile su povećanje koncentracije hemoglobina i pad RDW i broja eozinofila. Naši nalazi se podudaraju samo u pogledu porasta koncentracije hemoglobina sa radovima koji su ispitivali toksične uticaje ivermektina kod riba, u kojima je utvrđeno da se nakon jednokratne aplikacije u hematološkim parametrima javlja pad vrednosti hematokrita, porast koncentracije hemoglobina, broja leukocita, limfocita, monocita i koncentracije glukoze (Katharios i sar., 2001). Takođe, u ispitivanju delovanja ivermektina kod koza infestiranih šugom, javlja se nakon terapije porast koncentracije hemoglobina i broja eritrocita, a pad ukupnog broja leukocita (Habeeb, 2015). Kada su u pitanju leukociti, u našem istraživanju se javio značajan pad broja eozinofila, dok ukupan broj leukocita nije pokazao značajnije varijacije. Samo se kod jednog psa javio porast broja ukupnih leukocita iznad fizioloških granica nakon terapije ivermektinom, što može ukazivati na to da imunološki odgovor organizma na uništavanje parazita nije bio preterano jak ili da opterećenje parazitima nije bilo veliko kod naših pacijenata. Takođe uzimajući u obzir da se "tzv. *slow-kill*" metodom paraziti ubijaju postepeno, a ne sinhrono, nije došlo do masovnog oslobađanja antigena nakon uginjavanja parazita,

a time ni do izraženog imunološkog odgovora koji bi bio praćen drastičnim uvećanjem broja ukupnih leukocita. Kada je u pitanju RDW, porast ovog parametra u humanoj medicini je identifikovan kao negativni prognostički indikator kod osoba sa kardiovaskularnim i trombotičnim poremećajima, a takođe je utvrđen porast RDW kod pasa sa pulmonalnom arterijskom hipertenzijom (Mazzotta i sar., 2016). U istom istraživanju je uočeno da RDW pozitivno korelira sa porastom ukupnog broja leukocita i uree, a negativno sa koncentracijom hemoglobina i hematokritom, što se može primetiti i u našem istraživanju. Ako se porast RDW uzme kao rani prediktor kardiovaskularnih oštećenja i pulmonalnih bolesti, tada se možda može zaključiti da su naši psi završili terapiju bez većih oštećenja kardiovaskularnog i respiratornog sistema, jer se u istraživanju javio pad vrednosti RDW, što pokazuje i odsustvo ili brzo nestajanje simptoma bolesti srčanog crva tokom terapije, kao i to što psi u godinu dana nakon završetka terapije nisu razvili nikakve komplikacije vezane za ove organske sisteme.

Tabela 1. Prosečne vrednosti u laboratorijskom nalazu i procenat životinja sa vrednostima hematoloških parametara izvan referentnih vrednosti u momentu dijagnostikovanja oboljenja i posle završene terapije.

Table 1. Average values in the laboratory findings and the percentage of animals with values of hematological parameters outside the reference values at the time of diagnosing the disease and after completion of therapy.

Parametar	Pri detekciji oboljenja			Posle terapije		
	Srednja vrednost ± SD	Broj pasa (%) iznad referentne vrednosti	Broj pasa (%) ispod referentne vrednosti	Srednja vrednost ± SD	Broj pasa (%) iznad referentne vrednosti	Broj pasa (%) ispod referentne vrednosti
Leukociti (10 ⁹ /l)	9,88±3,23	- (0%)	2 (13,33%)	9,52±3,4	1 (6,66%)	2 (13,33%)
Eritrociti (10 ¹² /l)	7,01±1,21	2 (13,33%)	1 (6,66%)	7,25±1,12	1 (6,66%)	1 (6,66%)
HGB (g/l)	162,1±25	3 (20%)	1 (6,66%)	173,5±25	6 (40%)	1 (6,66%)
Hematokrit (%)	47,26±7,4	- (0%)	2 (13,33%)	50,03±6,9	3 (20%)	1 (6,66%)
MCV (fl)	67,6±3,7	- (0%)	1 (6,66%)	69,2±2,6	- (0%)	- (0%)
MCH (pg)	23,25±1,6	2 (13,33%)	1 (6,66%)	23,97±1,2	4 (26,66%)	- (0%)
MCHC (g/l)	343±11	1 (6,66%)	1 (6,66%)	346±14	2 (13,33%)	1 (6,66%)
PLT (10 ⁹ /l)	294±160	1 (6,66%)	6 (40%)	309±105	1 (6,66%)	2 (13,33%)
Limfociti (10 ⁹ /l)	2,66±1,41	1 (6,66%)	- (0%)	2,32±1,3	1 (6,66%)	- (0%)
Monociti (10 ⁹ /l)	0,50±0,34	- (0%)	2 (13,33%)	0,49±0,39	- (0%)	1 (6,66%)
Eozinofili (10 ⁹ /l)	0,44±0,69	1 (6,66%)	3 (20%)	0,19±0,1	- (0%)	- (0%)
Neutrofili (10 ⁹ /l)	6,06±1,87	- (0%)	- (0%)	6,63±2,44	- (0%)	- (0%)
Limfociti (%)	27,7±9,03	5 (33,33%)	- (0%)	26,3±8,9	4 (26,66%)	- (0%)
Monociti (%)	6,16±5,05	1 (6,66%)	- (0%)	4,21±2,0	1 (6,66%)	- (0%)
Eozinofili (%)	3,73±4,43	1 (6,66%)	5 (33,33%)	2,45±1,65	- (0%)	7 (46,66%)
Neutrofili (%)	62,6±10,1	- (0%)	6 (40%)	67,8±9,4	1 (6,66%)	2 (13,33%)
RDW (%)	13,8±2,12	2 (13,33%)	3 (20%)	12,98±1,5	1 (6,66%)	5 (33,33%)
PCT (%)	0,25±0,1	- (0%)	- (0%)	0,22±0,06	- (0%)	- (0%)
MPV (fL)	9,97±4,19	5 (33,33%)	1 (6,66%)	8,67±3,41	3 (20%)	4 (26,66%)
PDW (%)	15,6±0,87	- (0%)	- (0%)	15,46±0,8	- (0%)	- (0%)

U našoj studiji utvrđen je porast ukupnih proteina, koncentracije uree, kreatinina, glukoze, kalcijuma i fosfora kod po jedne jedinke, kod dva psa je uočen porast koncentracije holesterola, tri psa su imala porast vrednosti ALP, četiri GGT, pet ALT i globulina, dok se kod osam pasa javio porast vrednosti AST i bilirubina. Snižavanje vrednosti u odnosu na referentne javilo se kod po jednog psa za

parametre ALB, AST i fosfor, kod dva psa je opala vrednost holesterola, a kod tri vrednost kalcijuma. Promene detektovane nakon šestomesečne terapije se mogu pripisati delovanju parazita i ivermektina u organizmu obolele jedinke. U nedostatku studija na ovu temu, objašnjenja toksičnih efekata na organizam koji se mogu uočiti laboratorijskim ispitivanjima krvi se mogu potražiti u radovima koji su istraživali patohistološke efekte dugotrajne primene ivermektina. Naime, patohistološkim pregledom zečeva i pacova kod kojih je vršena dugotrajna aplikacija ivermektina u terapijskim ili dvostrukim terapijskim dozama utvrđena je kongestije centralne vene, portalne vene sa sinusoidalnom dilatacijom različitog stepena u zavisnosti od terapijske doze, kao i tromboza i hijalinizacija zidova portalnih krvnih sudova. Takođe, mogu se utvrditi i različiti stepeni degenerativnih promena hepatocita u vidu blagih vakuolarnih, hidropsnih i masnih promena koje mogu da pređu u fokalne nekroze jetrinog parenhima, prilikom čega ozbiljnost lezija raste sa porastom doze i vremenom ekspozicije. Dalje, vakuolizacija hepatocita se može pripisati poremećajima funkcije membrane i celularnih proteina hepatocita nastalih u pokušaju njihove detoksifikacije, a stepen lezija se povećava i sa povećanim deponovanjem rezidua u hepatocitima (GabAllh i sar., 2017). Rezidue se u najvećoj koncentraciji nalaze u jetri, posebno kod preživara, a najviše koncentracije se beleže prvog dana od aplikacije nakon čega se rezidue smanjuju, a mogu se naći u sve manjim koncentracijama i 28 dana nakon terapije, kako se navodi u izveštaju Evropske agencije za lekove (EMA, 2004). Ponovljena aplikacija ivermektina dovodi do proizvodnje slobodnih radikala koji se akumuliraju u jetri i odgovorni su za njeno oštećenje (GabAllh i sar., 2017). U istraživanju Abd-Elhady i sar. (2013) porast AST i ALT se pripisuje promenama permeabilnosti usled hepatotoksičnosti i izlasku lizozomalnih enzima koji dalje pojačavaju otpuštanje ovih jetrinih enzima. Takođe se javlja i kongestija renalnih krvnih sudova, degeneracija renalnih tubula zbog vakuolizacije citoplazme, a sa većom dozom i degeneracija, nekroza i deskvamacija bubrežnog epitela (GabAllh i sar., 2017).

Tabela 2. Prosečne vrednosti u laboratorijskom nalazu i procenat životinja sa vrednostima biohemijskih parametara izvan referentnih vrednosti u momentu dijagnostikovanja oboljenja i posle završene terapije.

Table 2. Average values in the laboratory finding and the percentage of animals with values of biochemical parameters outside the reference values at the time of diagnosis of the disease and after completion of therapy.

Parametar	Pri detekciji oboljenja			Posle terapije		
	Srednja vrednost \pm SD	Broj pasa (%) iznad referentne vrednosti	Broj pasa (%) ispod referentne vrednosti	Srednja vrednost \pm SD	Broj pasa (%) iznad referentne vrednosti	Broj pasa (%) ispod referentne vrednosti
Uk.prot. (g/l)	70,5 \pm 11,6	2 (13,33%)	1 (6,66%)	66,4 \pm 5,6	1 (6,66%)	- (0%)
Albumini (g/l)	31,9 \pm 4,9	- (0%)	1 (6,66%)	31,4 \pm 4,04	- (0%)	1 (6,66%)
Globulini (g/l)	38,5 \pm 9,6	7 (46,66%)	1 (6,66%)	35 \pm 5,8	5 (33,33%)	- (0%)
Urea (mmol/l)	6,43 \pm 5,94	1 (6,66%)	2 (13,33%)	5,87 \pm 1,9	1 (6,66%)	- (0%)
Kreatinin (μ mol/l)	69,6 \pm 35,7	2 (13,33%)	2 (13,33%)	76,9 \pm 31,9	1 (6,66%)	- (0%)
Glukoza (mmol/l)	5,8 \pm 1,1	2 (13,33%)	- (0%)	5,5 \pm 0,73	1 (6,66%)	- (0%)
Bilirubin (μ mol/l)	9,03 \pm 5,24	8 (53,33%)	1 (6,66%)	10,8 \pm 5,5	8 (53,33%)	- (0%)
ALT (IU/l)	69,4 \pm 68,5	6 (40%)	1 (6,66%)	206 \pm 445	5 (33,33%)	- (0%)
AST (IU/l)	84 \pm 160,8	5 (33,33%)	- (0%)	64,3 \pm 63,5	8 (53,33%)	1 (6,66%)
ALP (IU/l)	71,3 \pm 54,5	3 (20%)	- (0%)	160 \pm 305	3 (20%)	- (0%)
GGT (IU/l)	2,84 \pm 1,44	- (0%)	- (0%)	7,04 \pm 4,5	4 (26,66%)	- (0%)
α -amilaza (IU/l)	899 \pm 345	- (0%)	- (0%)	659 \pm 329	- (0%)	- (0%)
CHOL (mmol/l)	5,51 \pm 1,98	6 (40%)	2 (13,33%)	5,0 \pm 2,35	2 (13,33%)	2 (13,33%)
TGC(mmol/l)	0,88 \pm 0,23	- (0%)	- (0%)	1,95 \pm 0,92	- (0%)	- (0%)
Ca (mmol/l)	2,77 \pm 0,39	4 (26,66%)	1 (6,66%)	2,50 \pm 0,36	1 (6,66%)	3 (20%)
P (mmol/l)	1,56 \pm 0,46	1 (6,66%)	- (0%)	1,52 \pm 0,48	1 (6,66%)	1 (6,66%)

Rezultati pokazuju da se najučestalije promene su se javile u parametrima jetre kako pri detekciji parazita, tako i nakon završetka lečenja, što bi moglo ukazivati da je jetra posle srca sledeći najugroženiji organ kod ovog oboljenja. Kod parametara koji ukazuju na očuvanost bubrežne funkcije nisu utvrđene značajnije promene što ukazuje da kod naših pacijenata nije došlo do slabije perfuzije kroz bubrege, što je donekle i očekivano s obzirom na kliničku sliku bolesti kod ispitivanih životinja jer su samo dva od petnaest pasa ocenjeni kao psi sa izraženijim simptomima bolesti. Albumini, trigliceridi, alfa-amilaza, PCT i PDW su parametri kod kojih nisu zapažene nikakve promene, kako pri dijagnostici oboljenja, tako ni posle završetka terapije. Bez obzira na postojanje promena, izračunavanjem i poređenjem srednjih vrednosti i standardnih devijacija hematoloških i biohemijskih parametara utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u parametrima izmerenim kod pasa pri detekciji bolesti i nakon završetka lečenja, što je verovatna posledica malog uzorka i velike varijabilnosti unutar grupa. Da bi se utvrdila varijabilnost, ustanovljen je broj i procenat pasa kod kojih je došlo do promena vrednosti parametara posle u odnosu na pre terapije, kao što je prikazano u Tabelama 3 i 4. Na osnovu ispitivanja razlike u hematološkim i biohemijskim parametrima, na nivou pojedinačnog uzorka krvi psa pre početka terapije i nakon šest meseci od početka terapije izračunat je procenat odstupanja za svaki parametar svakog psa koji je dalje upoređivan sa RCV 95% vrednostima istog parametra prema Bourgès-Abella i sar. (2015). Na taj način je utvrđeno da kod određenog procenta pasa dolazi do variranja krvnih parametara koji se ne mogu pripisati biološkoj varijabilnosti, već se mogu pripisati delovanju ivermektina.

Tabela 3. Promena u vrednosti hematoloških parametara u krvi posle terapije u odnosu na početak terapije ivermektinom protiv srčanog crva.

Table 3. Change in the value of hematological parameters in the blood after therapy compared to the beginning of ivermectin therapy against heartworm.

Parametar	Broj i % pasa kod kojih je došlo do opadanja vrednosti	Broj i % pasa kod kojih je došlo do porasta vrednosti	% pasa kod kojih je variranje izvan slučajne biološke varijacije i može se pripisati delovanju leka
Leukociti ($10^9/l$)	9 (60%)	6 (40%)	13,33%
Eritrociti ($10^{12}/l$)	7 (46,66%)	8 (53,33%)	33,33%
Hemoglobin (g/l)	6 (40%)	9 (60%)	33,33%
Hematokrit (%)	5 (33,33%)	10 (66,66%)	40%
MCV (fl)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	20%
MCH (pg)	6 (40%)	7 (46,66%)	26,66%
MCHC (g/l)	5 (33,33%)	10 (66,66%)	13,33%
Trombociti ($10^9/l$)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	26,66%
Limfociti ($10^9/l$)	7 (46,66%)	8 (53,33%)	53,33%
Monociti ($10^9/l$)	11 (73,33%)	2 (13,33%)	46,66%
Eozinofili ($10^9/l$)	6 (40%)	5 (33,33%)	/
Neutrofilii ($10^9/l$)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	13,33%
Limfociti (%)	6 (40%)	9 (60%)	/
Monociti (%)	11 (73,33%)	3 (20%)	/
Eozinofili (%)	9 (60%)	5 (33,33%)	/
Neutrofilii (%)	7 (46,66%)	8 (53,33%)	/
RDW (%)	7 (46,66%)	7 (46,66%)	53,33%
PCT (%)	9 (60%)	5 (33,33%)	/
MPV (fL)	10 (66,66%)	4 (26,66%)	/
PDW (%)	7 (46,66%)	6 (40%)	/

Tabela 4. Promena u vrednosti biohemijskih parametara u krvi posle terapije u odnosu na početak terapije ivermektinom protiv srčanog crva.

Table 4. Change in the value of biochemical parameters in the blood after therapy compared to the beginning of ivermectin therapy against heartworm.

Parametar	Broj i % pasa kod kojih je došlo do opadanja vrednosti	Broj i % pasa kod kojih je došlo do porasta vrednosti	% pasa kod kojih je variranje izvan slučajne biološke varijacije i može se pripisati delovanju leka
Ukupni proteini (g/l)	7 (46,66%)	7 (46,66%)	26,66%
Albumin (g/l)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	20%
Globulini (g/l)	9 (60%)	6 (40%)	/
Urea (mmol/l)	7 (46,66%)	8 (53,33%)	33,33%
Kreatinin (μmol/l)	6 (40%)	9 (60%)	60%
Glukoza (mmol/l)	7 (46,66%)	8 (53,33%)	13,33%
Bilirubin (μmol/l)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	13,33%
ALT (IU/l)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	40%
AST (IU/l)	6 (40%)	9 (60%)	60%
ALP (IU/l)	8 (53,33%)	7 (46,66%)	13,33%
α-amilaza (IU/l)	10 (66,66%)	5 (33,33%)	/
Holesterol (mmol/l)	11 (73,33%)	2 (13,33%)	13,33%
Trigliceridi (mmol/l)	5 (33,33%)	9 (60%)	60%
Kalcijum (mmol/l)	9 (60%)	6 (40%)	60%
Fosfor (mmol/l)	9 (60%)	6 (40%)	46,66%

Zaključak

Aplikacija ivermektina dva puta mesečno u dozi od 10 μg/kg t.m. u trajanju od šest meseci u cilju lečenja bolesti srčanog crva kod pasa dovodi do značajnog variranja pojedinih parametara posle terapije u odnosu na pre početka terapije. Dobijeni rezultati ukazuju da je potrebno češće kontrolisati životinje prilikom dugotrajne primene ivermektina, detaljno obavestiti vlasnike o efektima leka tokom dugotrajne primene, a po potrebi razmotriti i upotrebu suplemenata za koje postoje naučni dokazi da ublažavaju neželjene efekte ovog leka.

Literatura

- Abd-Elhady, H.K., Abou-Elghar, G.E. 2013. Abamectin induced biochemical and histopathological changes in the albino rat, *Rattus norvegicus*. *Journal of Plant Protection Research* 53(3):263-270.
- Atyha, A.H., Alani, D.A.A. 2017. Study the effects of naturally acquired canine *Dirofilaria immitis* on some hematological and biochemical parameters. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine* 41(1):104-108.
- Bourgès-Abella, N.H., Gury, T.G., Geffré, A., Concordet, D., Thibault-Duprey, K.C., Dauchy, A., Trumel C. 2015. Reference intervals, intraindividual and interindividual variability, and reference change values for hematologic variables in laboratory beagles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2015 54(1):17-24.
- Canga, A.G., Prieto, A.M.S., Liebana, M.J.D., Martinez, N.F., Vega, M.S., Vietez, J.J.G. 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal* 179:25-37.
- Cortese, L., Christopherson, P.W., Pelagalli A. 2020. Platelet function and therapeutic applications in dogs: current status and future prospects. *Animals* 10(201):201.
- Dey, S., Kurade, N.P., Khurana, K.L., Dan, A. 2017. Clinicobiochemical changes in ivermectin toxicity in Doberman pinscher pups. *Journal of Parasitic Diseases* 41(2):580-583.

- Epstein, S.E., Hollingsworth, S.R. 2013. Ivermectin-induced blindness treated with intravenous lipid therapy in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23(1):58-62.
- EMA-European Medicines Agency. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. EMEA/MRL/915/04-FINAL; 2004.
- GabAllh, M.S., El-Mashad, A.B.E., Amin A.A., Darweish M.M. 2017. Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Behna Veterinary Medical Journal* 32(1):104-112.
- Habeeb, B.K. 2015. Hematological and biochemical changes following Ivermectin treatment in mange infested goats. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Sciences* 14(1):69-74
- Hopper, K., Aldrich, J. Haskins, S.C. 2002. Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16(1):89-94.
- Islam, S.T., Ganaie, M.Y., Kubra, S.S., Ali, R., Singh, A.K. 2017. Ivermectin toxicity in a German shepherd cross breed dog: a case study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11):1452-1455.
- Katharios, P., Iliopoulou-Georgudaki, J., Kapata-Zoumbos, K., Spiropoulos, S. 2001. Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 25:99-108.
- Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. 2017. Ivermectin - old drug, new tricks?. *Trends in Parasitology* 33(6):463-472.
- Lefkaditis, M.A., Zavlaris, M., Koukeri, S.E., Cozma, V. 2008. Study on the hematological and biochemical changes in dogs infected by *Dirofilaria immitis*. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca* 65(2):60-65.
- Mazzotta, E., Guglielmini, C., Mencioti, G., Contiero, B., Toaldo, M.B., Berlanda, M., Poser, H. 2016. Red blood cell distribution width, hematology, and serum biochemistry in dogs with echocardiographically estimated precapillary and postcapillary pulmonary arterial hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(6):1806–1815.
- Merola, V.M., Eubig, P.A. 2012. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of p-glycoprotein in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 42(2):313.
- Mogalhaes, V.S., Cid, Y.P., Ferreira, T.P., Medeiros, D.M.V., Batista, L.C.S.O., Correia, T.R., Albert, A.L.M., Scott, F.B. 2016. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against experimental infection of *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* 228:167-171.
- Niwetpathomwat, A., *Kaewthamasorn, M.*, Tiawsirisup, S., Techangamsuwan, S., Suvarnvibhaja, S. 2007. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Sciences* 82(3):364-369.
- Panigrahi, P.N., Gupta, A.R., Patra, R.C., Mohanty, B.N., Maiti, A., Sahoo, G.R. 2016. Comparative anthelmintic efficacy of ivermectin delivered through different routes in gastrointestinal nematode infection. *Journal of Parasitic Diseases* 40(1):46-51.
- Qureshi S. 2013. Biochemical toxicity of ivermectin in Wistar albino rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 5(1):15-19.
- Ranjbar-Bahadori, S., Mohri, M., Helan, J.A., Jamshidi, K., Kashfinejad, M.* 2010. Clinico-pathologic evaluation of the canine heartworm infestation. *Research Journal of Parasitology* 5(2):90-98.
- Singh, P.K., Johri, A., Verma, M.K., Diwakar, R.P., Yadav, V. 2018. Ivermectin toxicity occurring in Pomeranian (puppy) male dog: a case study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7:299-302.
- Tabrizi, B.A. 2012. Evaluation of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase in *Dirofilaria immitis* Infection in dogs. *World Journal of Zoology* 7(1):79-82.
- Veit, O., Beck, B., Steuerwald, M., Hatz, C. 2006. First case of ivermectin-induced severe hepatitis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100:795-797.

Changes in hematological and biochemical parameters of canine blood during long-term use of ivermectin for the treatment of heartworm disease

Sandra Nikolić^{a*}, Dragica Stojanović^a, Marko Cincović^a, Mira Majkić^a, Maja Došenović Marinković^a, Jovan Spasojević^a, Ivan Galić^a, Filip Štrbac^a, Dražen Kovačević^a

^aUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

*Corresponding author: neckovs021@gmail.com

ABSTRACT

Ivermectin is an antiparasitic medicine that belongs to the macrocyclic lactone family. It is highly effective against endo- and ecto- parasites at low doses, and lately it is most widely used in the treatment and prophylaxis of canine heartworm disease. The aim of this study was to determine whether there is the occurrence of changes in hematological and biochemical blood parameters due to the long-term application of ivermectin, at doses of 10 µg/kg b.w., in heartworm disease treatment, that can be attributed to the effect of the medicine. This study was conducted on dogs with heartworm disease that received ivermectin twice a month for six months. Blood was collected at the moment of diagnosis, before treatment and after six months of therapy. The results showed that application of ivermectin twice a month, at doses of 10 µg/kg b.w., during a six-month period of heartworm treatment, induced significant variability of the certain parameters after the treatment in regard to before the treatment. The greatest variability in hematological findings that can be attributed to the effects of medicine was shown by total lymphocyte count and RDW (53.33%), monocyte count (46.66%), hematocrit (40%), total red blood cells count and hemoglobin (33.33%), MCH and platelets (26.66%), total white blood cells count, MCHC and neutrophils (13.33%), respectively. The variation that can be associated with the effects of ivermectin in biochemical parameters was demonstrated in 60% of the dogs for the parameters creatinine, AST, triglycerides and calcium, 46.66% phosphorus, 40% ALT, 33.33% urea, 26.66% total protein, 20% albumin, 13.33% glucose, bilirubin, ALP and cholesterol, respectively. These results point out that better control of animals should be provided during long-term use of ivermectin, also that the owners should be thoroughly informed about the effects of the medicine and that some consideration should be given to the use of supplements which could ease the side effects of ivermectin.

KEY WORDS: Ivermectin, hematological and biochemical parameters, Heartworm disease, variability

Primljen: 08.01.2022.

Prihvaćen: 25.02.2022.