



Veterinar

Znanstveno-stručni časopis studenata veterinarske medicine

Utemeljen 1938.



ISSN: 0303-5409

Godina **2017.**

Godište **55.**

Broj **1.**

Veterinar

Znanstveno - stručni časopis studenata veterinarske medicine

Utemeljen 1938.

**Izdavač
Publisher**

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine
Heinzelova 55, 10 000 Zagreb

**Web stranica
Web Site**

<http://www.vef.unizg.hr/veterinar>

**Adresa uredništva
Editorial Office**

Heinzelova 55, 10 000 Zagreb
tel.: +385 (0)1 2390 111
e-mail: veterinar@vef.hr

**Glavna urednica
Editor-in-Chief**

Iva Benvin
e-mail: iva.benvin55@gmail.com
mob. +385 (0)99 590 2559

**Zamjenica urednika
Deputy Editor**

Stefani Fruk

**Grafički urednik
Graphics Editor**

izv. prof. dr. sc. Krešimir Severin

**Studentski urednički odbor
Students' Editorial Board**

Ivona Baketarić
Iva Benvin
Krunoslav Bodalec
Zvonimir Delač

Ivana Filipčić
Stefani Fruk
Andrej Kupres

**Urednički kolegij
Editorial Board**

izv. prof. dr. sc. Martina Đuras
doc. dr. sc. Gordana Gregurić Gračner
doc. dr. sc. Suzana Hađina
doc. dr. sc. Marko Hohšteter
izv. prof. dr. sc. Ivana Kiš

doc. dr. sc. Dean Konjević, dipl. ECZM
prof. dr. sc. Boris Pirkić
izv. prof. dr. sc. Krešimir Severin
dr. sc. Vesna Špac, dipl. ing., dipl. bibl.
doc. dr. sc. Silvijo Vince

**Lektori
Revisors**

Željana Klječanin Franić, prof. – hrvatski jezik
Janet Ann Tuškan, prof. – engleski jezik

**Naklada
Print Run**

300

Fotografija na naslovnoj stranici: Marija Gladović, studentica Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Časopis Veterinar novčano podupire Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Svi izvorni znanstveni radovi, stručni članci, pregledni članci, stručne rasprave i prikazi slučaja podliježu recenziji dvaju recenzenata. Popularizacijski i drugi članci ne podliježu recenziji.

Časopis ne odgovara za točnost objavljenih tekstova ili eventualne tiskarske pogreške.



Dragi čitatelji,

veliko mi je zadovoljstvo obratiti vam se i predstaviti novi broj „Veterinara“, znanstveno-stručnog časopisa studenata veterinarske medicine. Časopis je utemeljen 1938. godine, s kratkim prekidima u kontinuitetu izlaženja, te ujedno predstavlja dugu tradiciju i obilježje ponajprije studenata veterinarske medicine koji su i ključni u njegovu stvaranju.

U novom broju „Veterinara“ objavljena su dva izvorna znanstvena rada i dva stručna rada iz različitih područja veterinarske medicine. Svaki objavljeni znanstveno-stručni rad, kao i u prethodnim brojevima, nastao je u suradnji studenata veterinarske medicine s njihovim mentorima. Također je, i u ovom broju, objavljeno nekoliko popularizacijskih članaka studentskih udruga Veterinarskoga fakulteta te članaka o studentskim boravcima u inozemstvu. Među ostalim, objavljen je i popularizacijski članak na engleskom jeziku o Erasmus studijskom boravku studenta iz Albanije na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Nadam se da ćete sadržaj novoga broja časopisa pronaći korisnim i uživati čitajući ga.

Časopis „Veterinar“ odsada izlazi dva puta godišnje te ovom prigodom pozivam sve zainteresirane autore da se uključe u stvaranje sljedećeg broja dostavljajući nam svoje radove i da na taj način podrže časopis u idućem razdoblju.

Na kraju, željela bih zahvaliti svim autorima koji su časopis „Veterinar“ prepoznali kao mjesto širenja i predstavljanja svojih radova te iskustava i spoznaja iz područja veterinarske medicine. Zahvaljujem i recenzentima, koji su izdvojili svoje vrijeme i dali mnogo truda kako bi pomogli povećati znanstvenu vrijednost objavljenih radova. Velika hvala Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na potpori koju nam pruža omogućujući izlazak i tiskanje novoga broja „Veterinara“. Posebno zahvaljujem članovima Uredničkog kolegija i Uredničkog odbora te ostalim suradnicima koji su sudjelovali u stvaranju novoga broja časopisa te se nadam da ćemo i dalje zajednički planirati budućnost časopisa, ostvariti kontinuirano izlaženje, povećati njegovu kvalitetu te postići još veću prepoznatljivost.

Iva Benvin, glavna urednica

Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije



Comparative analysis of canine testicular tumors using histopathological and flow cytometry methods

Mihoković, S.^{1*}, D. Kezić², M. Mišić³, M. Popović², M. Hohšteter⁴

Sažetak

Tumori sjemenika pasa najčešći su tumori spolnog sustava te među najčešćim tumorima pasa uopće. Većinom se dijagnosticiraju u kasnijoj fazi, kada dođe do povećanja sjemenika, te se u svrhu liječenja obavlja kastracija nakon koje se postavlja dijagnoza na temelju histopatološke pretrage.

U ovom je istraživanju provedena histopatološka analiza i klasifikacija arhiviranih uzoraka najčešćih tumora sjemenika pasa (9 uzoraka) i jednog uzorka nepromijenjenog sjemenika, te je provedena analiza DNK metodom protočne citometrije. Provedenom komparativnom analizom nastojala se utvrditi korelacija između tipova tumora i rezultata protočne citometrije, tj. jesu li promjene u genetičkim ili fizikalnim svojstvima tumorskih stanica povezane s histološkim tipom tumora. Utvrđeno je da je histopatološka pretraga objektivna dijagnostička metoda za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa. Dobiveni rezultati protočne citometrije, iako nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, pokazuju da je primjenom protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa moguće dobiti nove informacije o svojstvima stanica. Kako bi se protočna citometrija i njezini rezultati mogli objektivnije analizirati te koristiti u dijagnostici neoplazija testisa u pasa, potrebno je optimizirati i standardizirati metodu te postaviti detaljne dijagnostičke kriterije, za što je potrebno provesti istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.

Metoda protočne citometrije može pomoći u dijagnostici tumora sjemenika pasa, osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama pretrage kao što je histopatološka analiza tumora sjemenika.

Abstract

Canine testicular tumors are the most prevalent male genital neoplasms and among the most common canine neoplasms overall. Most of these neoplasms are diagnosed in the late phase when testicular enlargement is observed. Castration is followed by histopathological analysis, which is performed for both therapeutic and diagnostic purposes.

In this research, histopathological analysis and classification was undertaken together with DNA analysis by flow cytometry of archived samples of the most common canine testicular neoplasm (9 samples) and one of neoplastically unchanged testicle. The aim of this study was to find a correlation between different tumor types and the results of flow cytometry. Our results showed

¹Sanja Mihoković, dr. med. vet., PrimeVigilance Zagreb d.o.o.,

²dr. sc. Dubravko Kezić i prof. dr. sc. Maja Popović, Zavod za biologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

³Marija Mišić, mag. mol. biol., Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁴doc. dr. sc. Marko Hohšteter, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail: sanja.mihokovic@gmail.com

Ključne riječi: pas, testis, tumor, histopatologija, protočna citometrija

Key words: dog, testicle, tumor, histopathology, flow cytometry

that histopathological analysis represents an objective diagnostic method for differentiation of different canine testicular tumors. The results of flow cytometry, although not sufficiently precise for drawing definitive conclusions on the characteristics of the testicular neoplasm, show that flow cytometry can give new information about these neoplastic cells. For better results and application of flow cytometry in canine testicular neoplasm diagnosis, optimization and standardization of this method by establishing detailed diagnostic criteria should be undertaken. For this, investigation of a large number of neoplastic and non-neoplastic testicle samples is required.

In conclusion, the flow cytometry method has the capacity to improve diagnosis of canine testicular neoplasms, especially combined with the standard histopathological method.

UVOD

Tumori sjemenika najčešći su tumori genitalnog sustava muških pasa gdje čine oko 90 % svih genitalnih tumora (North i sur., 2009.). Na temelju istraživanja provedenog u Republici Hrvatskoj, u razdoblju od tri godine (2006. – 2009.) tumori spolnog sustava čine oko 7,97 % od svih tumora pasa (Šoštarić-Zuckermann i sur., 2013.). Dobna predispozicija vrlo je bitan čimbenik u razvoju tumora, na što upućuju brojna istraživanja koja su pokazala da se tumori sjemenika najčešće pojavljuju u starijih pasa. Tri najčešća primarna tumora sjemenika jesu tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica, seminomi i tumori Sertolijevih stanica (Hohšteter i sur., 2012.; McGavin i Zachary, 2006.). U manjoj mjeri mogu se razviti i tumori testikularnih mezenhimnih struktura ili, vrlo rijetko, metastatski tumori. Biološko ponašanje tumora sjemenika u pasa najčešće je benignog karaktera (Hohšteter, 2012.; McGavin i Zachary, 2006.). U malom broju slučajeva pojavljuju se uginuća pasa kao posljedica tumora sjemenika, no isto tako često posljedica može biti neplodnost životinja. Metastaze koje se mogu pojaviti, očituju se čvorovima u sjemenom užetu, skrotalnim limfnim čvorovima i izvan njih (McGavin i Zachary, 2006.).

Klasifikacija tumora sjemenika u pasa relativno je jednostavna, za što postoji nekoliko mogućih razloga, a to su prije svega njihova benignost, oskudna istraživanja imunohistokemijskih biljega, te drugih obilježja važnih za diferencijaciju tumora sjemenika, kao i vrlo mali broj istraživanja koja se provode na neklasificiranim intratubularnim neoplazijama zametnih stanica (engl. *intratubular germ cell neoplasia of undifferentiated origin*, IGCNU).

Protočna citometrija jest analitička metoda kojom se, među ostalim, mogu analizirati fizikalna svojstva stanica, odnosno njihova veličina, oblik i zrnatost, kao i drugi parametri (promjene u jezgri ili kariotipu stanica, broj mitoz). Na temelju ovih parametara može se utvrditi heterogenost populacije stanica te razlikovati pojedine podskupine i odrediti njihov udio unutar određene populacije stanica. Metoda protočne citometrije temelji se na mjerenju raspršenja svjetlosti i fluorescencije koja nastaje prolaskom suspenzije stanica kroz fokusiranu lasersku zraku. Količina raspršenog svijetla ovisi o veličini, obliku i homogenosti stanice ili drugih čestica koje prolaze kroz lasersku zraku, no isto tako i o kutu iz kojega se raspršenje mjeri. Sadržaj DNK u jezgri odgovara intenzitetu fluorescencije prilikom prolaska suspenzije stanica kroz lasersku zraku. Na temelju toga moguće je pomoću protočnog citometra odrediti u kojoj se fazi staničnog ciklusa nalazi određeni broj tumorozno promijenjenih stanica (Cooper, 2000., Ormerod, 2009.). Velika prednost ove metode jest njezina brzina kojom se mogu dobiti rezultati analize stanica (i do nekoliko tisuća stanica u sekundi) uz veliku preciznost i specifičnost, kao i mogućnost praćenja više parametara na jednoj stanici u populaciji istodobno (veličina, zrnatost, oblik, sadržaj DNK stanica, faze staničnog ciklusa) (Ormerod, 2009.). Za ispitivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom mogu se koristiti uzorci svježeg tkiva ili uzorci tkiva uklopljeni u parafin. U Republici Hrvatskoj protočna se citometrija većinom ne koristi kao rutinska metoda u veterinarskoj medicini, no iznimke ipak postoje, kao što je to slučaj kod primjene protočne citometrije kao rutinske metode u procjenjivanju ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku (Samaržija, 2004.).

Budući da su vlasnici životinja u današnje vrijeme iznimno zainteresirani za liječenje tumora svojih kućnih ljubimaca, osobito životinja poželjnih genetičkih osobina, bilo kakva nova spoznaja u dijagnostici, terapiji i prevenciji neplodnosti, kao i uginuća životinja iznimno je korisna. Zbog općenito vrlo malog broja istraživanja u području tumora sjemenika kod pasa, i u Hrvatskoj i u ostatku svijeta, utvrđivanje korelacije između rezultata histopatološke analize tumora te analize rezultata dobivenih primjenom protočne citometrije u svrhu utvrđivanja utjecaja genetičkih i molekularno patoloških karakteristika tumorskih stanica na biološko ponašanje tumora testisa, važno je radi dobivanja novih spoznaja koje mogu pridonijeti boljoj dijagnostici, prognozi i liječenju ovih bolesti.

MATERIJALI I METODE

Uzorci

Za potrebe istraživanja korišteni su arhivirani uzorci tumora sjemenika pasa sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi analizirani tumori bili su dostavljeni na patohistološku pretragu Zavoda ili su uzeti od životinja koje su bile dostavljene na Zavod u svrhu razudbe u razdoblju od 2007. do 2010. godine. Histopatološka analiza i analiza protočnim citometrom provedene su na devet nasumično odabranih arhiviranih uzoraka tumora sjemenika pasa koji su makroskopski bili promijenjeni te na jednom makroskopski nepromijenjenom uzorku testisa. Komparativnom analizom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije nastojala se utvrditi korelacija između tipova tumora i rezultata protočne citometrije, tj. jesu li promjene u genetičkim ili fizikalnim svojstvima tumorskih stanica povezane s histološkim tipom tumora.

Histopatološka pretraga

U svrhu histološke analize uzoraka tumora sva tkiva sjemenika, odnosno njihovi dijelovi fiksirani su u 10 %-tnom puferiranom formalinu i uklopljeni u parafin. Za bojenje uzoraka tumora korištena je rutinska metoda bojenja, hematoksilin-eozin (HE) metoda. Histološki su uzorci analizirani svjetlosnim mikroskopom (OLYM-

PUS, CX 21), najprije pod povećanjem od 100x, a nakon toga i pod povećanjem od 400x. Histološka klasifikacija tumora sjemenika provedena je u skladu s kriterijima klasifikacije tumora sjemenika pasa i ljudi Svjetske zdravstvene organizacije (KENNEDY i sur., 1998.).

Protočna citometrija

U svrhu analize protočnim citometrom korištena su tkiva pohranjena u formalinu i tkiva uklopljena u parafinske blokove rezana na debljinu od 40 µm. Uzorci tkiva prvo su obrađeni kako bi se uklonili ostaci parafina. Parafin je uklonjen potapanjem uzoraka u ksilolu tijekom 30 minuta nakon čega je ksilol uklonjen vakuumskom sisaljkom. Uzorci su potom rehidrirani uzastopnim umakanjem u 100 %-tnom, 95 %-tnom i 70 %-tnom etanolu, s razmacima od po 10 minuta između umakanja u pojedine koncentracije, te su prije stavljanja uzoraka u drugu koncentraciju, ostaci prethodno dodanog etanola uklonjeni vakuumskom sisaljkom.

Nakon finalne rehidracije u destiliranoj vodi u trajanju od 10 min, voda je uklonjena vakuumskom sisaljkom te su oni inkubirani s 2 mL 0,5 %-tnog pepsina u 0,9 % NaCl (pH 1,5) kroz 60 minuta, prilikom kojih su uzorci bili uronjeni u vodenu kupelj na 37 °C uz stalno miješanje.

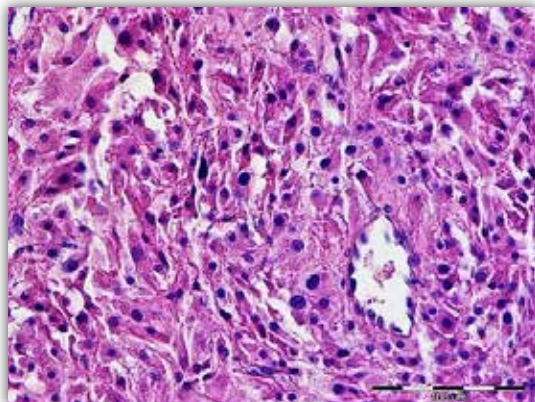
Uzorci su zatim profiltrirani kroz sito veličine 50 µm te centrifugirani na 400 G tijekom 5 minuta. Zatim je uzorcima dodano 50 µL 100 µg/mL ribonukleaze A (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 200 µL 50 µg/mL propidij-jodida (Sigma-Aldrich, Njemačka) te su pohranjeni na +4 °C preko noći. Sljedeći dan su uzorci analizirani protočnim citometrom EPICS XL (Beckman-Coulter, USA). Dobiveni rezultati analizirani su Flowlogic programom (Invai technologies, Australija).

REZULTATI

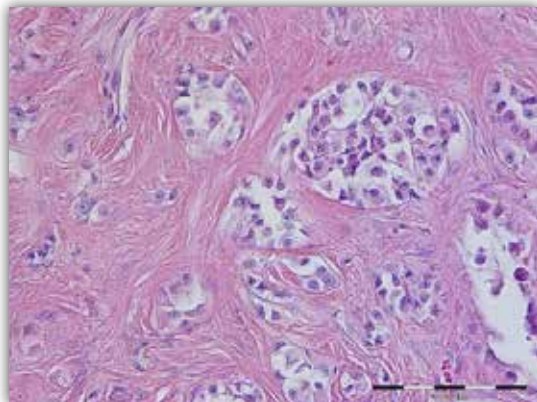
Histološka analiza tumora sjemenika pasa

Od ukupno deset uzoraka tumora sjemenika na kojima je rađena patohistološka analiza, četiri su uzorka bila seminomi (40 %) (slike 3 i 4), tri uzorka tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica (30 %) (slika 1), te po jedan uzorak tumora Sertolijevih stanica (10 %) (slika 2), mješovitog tumora Leydigovih i Sertolijevih stanica

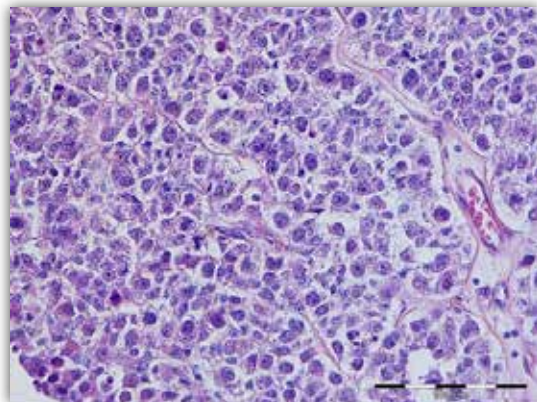
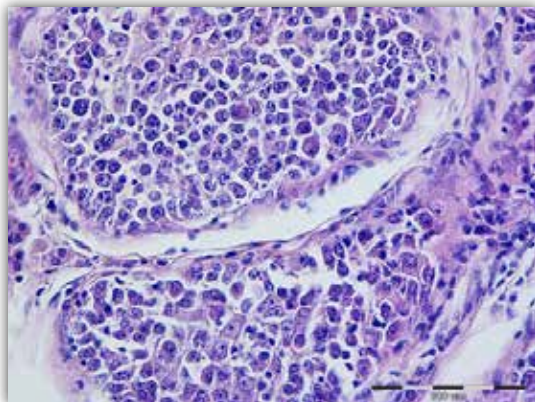
Slika 1. Lijevo: tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica psa. 400x (HE)



Slika 2. Desno: tumor Sertolijevih stanica psa. 400x (HE)

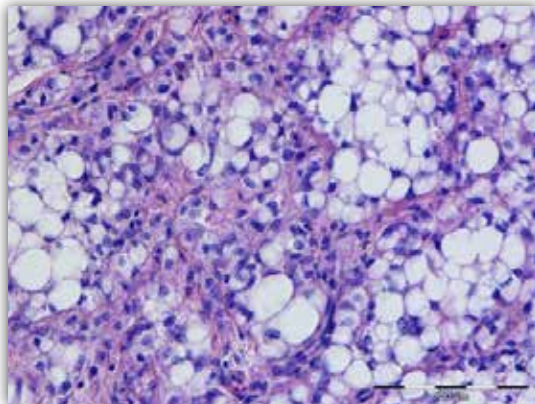


Slika 3. Lijevo: intratubularni oblik seminoma psa. 400x (HE)

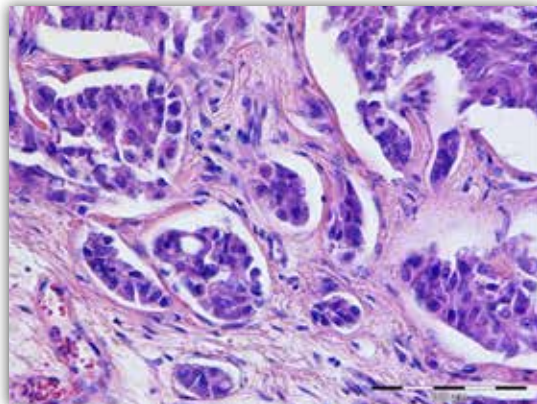


Slika 4. Desno: difuzni oblik seminoma psa. 400x (HE)

Slika 5. Lijevo: mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica, psa. Dio tumora s neoplastičnim Leydigovim stanicama. 400x (HE)



Slika 6. Desno: mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica psa. Dio tumora s neoplastičnim Sertolijevim stanicama. 400x (HE)



Tablica 1. Udio pojedinih vrsta tumora sjemenika pasa u ukupnom broju pretraženih uzoraka

Vrsta tumora	Ukupan broj	Postotak (%)
Seminom	4	40
Tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica	3	30
Tumor Sertolijevih stanica	1	10
Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica	1	10
Bez tumoroznih tvorbi	1	10

(10 %) (slike 5 i 6) i jedan uzorak bez tumorskih promjena (10 %), koji je služio kao negativna kontrola (tablica 1). Niti jedan od uzoraka tumora nije bio malignog karaktera.

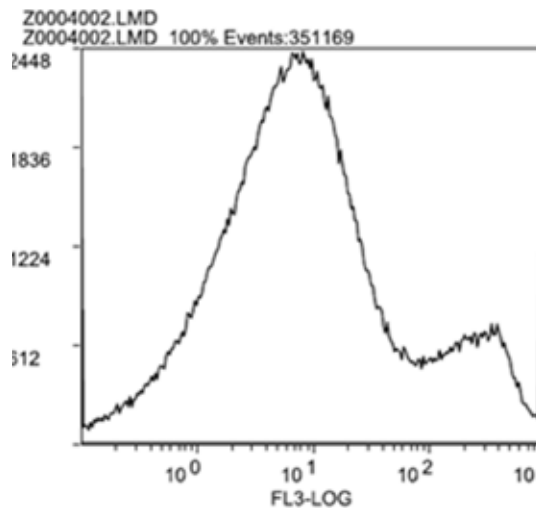
Protočna citometrija

Histogrami na kojima je prikazana FL3-LOG skala (slike 7-10) zapravo predstavljaju snagu fluorescencije koja raste logaritamski, što znači da su svi histogrami zapravo logaritamski stisnuti na skali radi lakšeg prikaza. Ovaj način prikaza lako može zavarati jer, ako je neki događaj na skali prikazan više desno, njegova snaga fluoresciranja ne raste linearno, kako se na prvi pogled čini, već se povećava za po jedno decimalno mjesto 10, 100, 1000 itd.

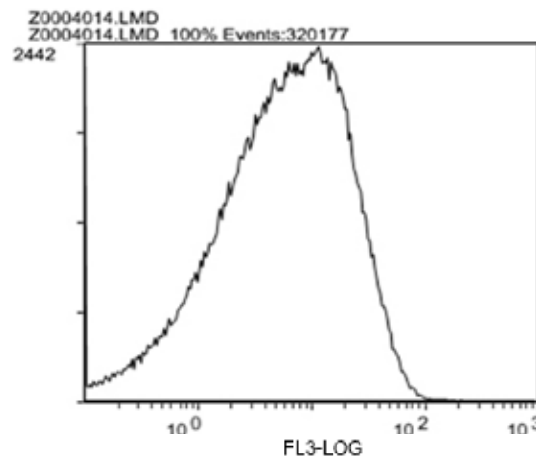
Na prikazu (slika 7) uzorka poliploidnog tumora sjemenika čovjeka (iz arhive Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) uočavaju se tri vrha. Veća količina DNA dovodi do većeg vezanja propidij-jodida te jače fluorescencije što se vidi na FL3 logaritamskoj ljestvici (apscisa). Prvi vrh predstavlja stanice s jednostrukom količinom DNA u G0/G1 fazi, dok drugi predstavlja stanice u G2/M fazi ciklusa s dvostrukom količinom DNA. Treći vrh pokazuje da poneke stanice sadržavaju veću količinu DNA te upućuje na poliploidnost uzorka.

Na uzorcima tumora testisa pasa nismo uspjeli dobiti veću razlučivost među populacijama stanica, no usprkos tome nijedan od analiziranih uzoraka ne pokazuje više vrhova, što znači da ti uzorci vjerojatno nisu poliploidni (slike 8-10). Smanjena razlučivost vjerojatno je uzrokovana prevelikim obojenjem propidij-jodidom. Uočava se samo po jedna homogena populacija stanica bez dodatnih vrhova na FL3 logaritamskoj ljestvici koji bi upućivali na povećanu količinu DNA u stanicama. Moguće je da se radi o dominantno jednom tipu stanica, tj. tumorskim staničnim klonovima pojedinih tipova stanica testisa (Sertolijeve, Leydigove i zametne stanice testisa).

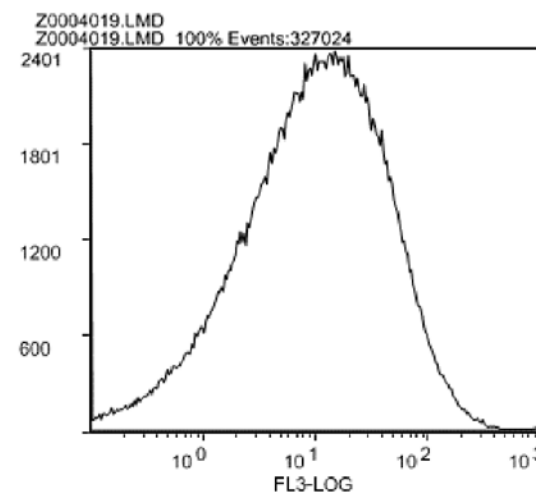
Na slici 11. prikazana je veličina i struktura (granuliranost) svake pojedinačne stanice tumora Sertolijevih stanica psa na linearnoj ljestvici. Na njemu se ne uočava više populacija, već se stanice jednostavno grupiraju u jednu homogenu masu gdje je veća prisutnost sitnih čestica koje su vjerojatno stanični fragmen-



Slika 7. Histogram s prikazom DNA poliploidnog uzorka tumora čovjeka. Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica. (Izvor: Arhiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

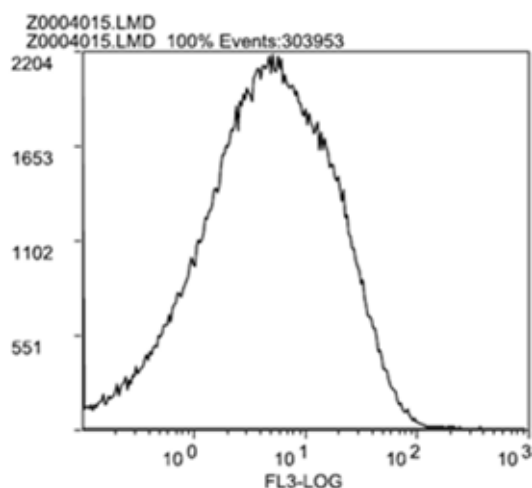


Slika 8. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Sertolijevih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.

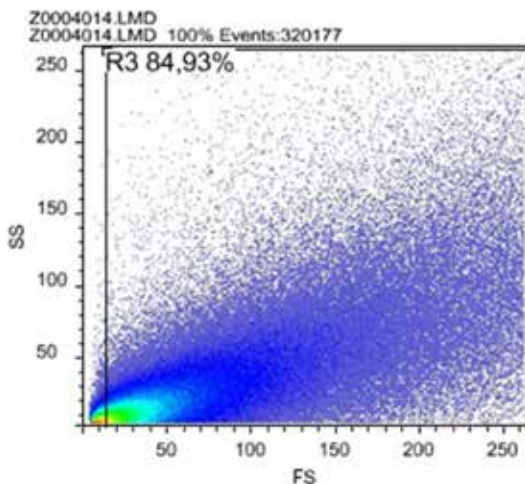


Slika 9. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (seminom). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.

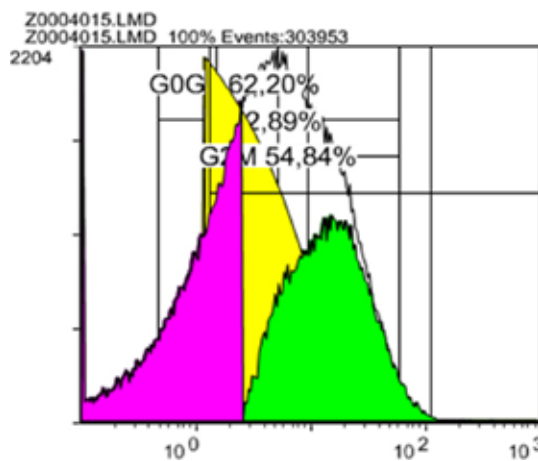
Slika 10. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Leydigovih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.



Slika 11. Dot-plot s prikazom veličine i strukture stanica tumora psa (tumor Sertolijevih stanica). Na SS ljestvici (ordinata) jest intenzitet raspršene svjetlosti koji ovisi o strukturi i kompleksnosti čestica u uzorku, a na FS ljestvici (apscisa) jest intenzitet raspršene svjetlosti u smjeru laserske zrake koji nam govori o relativnoj veličini čestice.



Slika 12. Histogram s prikazom algoritamskog razdvajanja vrha (peak) na faze staničnog ciklusa kod tumora psa (tumor Leydigovih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.



ti. Postotak od 84,93 % (desno od postavljene granice) pokazuje koje smo čestice uzeli u daljnju obradu (slika 11). S obzirom na to da bi nam premalene čestice samo dodatno otežavale analizu, čestice lijevo od postavljene granice isključili smo iz daljnje analize. Na SS ljestvici (ordinata) jest intenzitet raspršene svjetlosti koji ovisi o strukturi i kompleksnosti čestica u uzorku. Relativno nizak intenzitet pokazuje da su stanice u tumoru relativno jednostavne građe, bez mnogo krupnih staničnih elemenata. Na FS ljestvici (apscisa) jest intenzitet raspršene svjetlosti u smjeru laserske zrake, koji nam govori o relativnoj veličini čestice. Na slici 11 vidimo da imamo velik spektar veličina čestica koje se ipak grupiraju u donjem lijevom kutu. Ovakav je raspored za očekivati jer je uzorak dobiven razbijanjem međustaničnih veza enzimima te je velika količina detritusa i slijepljenih stanica normalna. Stoga je i granična crta postavljena na ovoj ljestvici jer računamo da premale čestice (u odnosu na ukupni uzorak) predstavljaju fragmente i prašinu te ih isključujemo iz daljnje analize kako ne bi autofluorescencijom otežavale daljnju analizu.

Analizom uzorka, pomoću Inivai Technologies FlowLogic programa, moguće je dobiti i algoritamski prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, što je vidljivo na slici 12.

RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je komparativna analiza tumora sjemenika pasa pomoću dvije različite pretrage tj. histopatološke pretrage i protočne citometrije. Željelo se utvrditi može li se histopatološka pretraga, koja služi za razlikovanje različitih tipova tumora sjemenika, upotpuniti metodom protočne citometrije te postoji li razlika u rezultatima analize protočnom citometrijom za pojedine tipove tumora.

Histopatološka pretraga potvrdila se kao pouzdana i kvalitetna metoda za diferencijaciju pojedinih tipova tumora sjemenika pasa (McGavin i Zachary, 2006.).

Pri izvedbi osjetljivih metoda, kao što je protočna citometrija, priprema uzoraka koji će se analizirati jedan je od najvažnijih čimbenika jer u najvećoj mjeri utječe na krajnje rezultate. Ovakav tip istraživanja do sada se nije provodio na tumorima sjemenika pasa (Reggeti i Bienzle,

2011.) te je zbog tog bilo teško postaviti protokol za njegovo izvođenje, što je dodatno otežalo provođenje ove analize. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da u svim analiziranim uzorcima nisu dobiveni dostatni, optimalni i dovoljno precizni rezultati koji bi uključivali broj i izgled kromosoma, količinu DNA te broj mitozu u jezgri. Iako postoji više različitih matematičkih modela po kojima je moguće izračunati udjele stanica u pojedinoj fazi ciklusa, nažalost zbog ograničenja matematički model nije u stanju dobro izračunati udjele ako se ne razlučuju vrhovi za G0/G1 fazu i M-fazu, što je u provedenom istraživanju bilo problem u daljnjoj analizi uzoraka. Iako u ovom slučaju nije dobiven idealan prikaz, prilagodbom protokola moguće je dobiti detaljniji uvid u količinu DNA u populaciji stanica te na temelju toga točnije algoritamski izračunati udjele stanica u pojedinoj fazi ciklusa. Temeljem dobivenih rezultata nije moguće donijeti definitivne zaključke o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena.

Dobiveni rezultati pokazuju da se primjenom metode protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa, koji su pripremljeni za histopatološku pretragu (parafinski blokovi), mogu dobiti nove informacije o svojstvima stanice koji uključuju podatke o veličini stanice, broju kromosoma, postotku stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, a oni mogu koristiti u diferencijaciji neoplastičnog od nepromijenjenog tkiva. Dobivanje nepotpunih podataka najvjerojatnije je posljedica pripreme samih uzoraka koja nije u potpunosti adekvatna jer postoje različiti protokoli za pripremu uzoraka tkiva, koje je u nekim slučajevima potrebno i kombinirati pa je, među ostalim, za dobivanje zadovoljavajućih rezultata potrebno protokol pripreme uzoraka tkiva prilagoditi i protočnom citometru koji se koristi u analizi.

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da bi, osim pripreme uzoraka tkiva koja će se analizirati, za bolje rezultate istraživanja trebalo tijekom izvođenja koristiti i različita razrjeđenja boja te utvrditi koja najbolje odgovaraju ispitivanom uzorku stanica i korištenom protočnom citometru. Osim toga, potrebno je utvrditi moguće dodatne postupke koje je potrebno primijeniti za dobivanje čiste populacije tumorskih stanica koja nam je od interesa za citometrijsku analizu.

Provođenjem ovog istraživanja utvrdili smo da postoji mogućnost da se protočna citometrija koristi kao jedna od metoda u dijagnostici tumora sjemenika pasa. No, usprkos tome potrebno je postavljanje detaljnih dijagnostičkih kriterija pomoću kojih bi se mogli usporediti rezultati analize protočne citometrije s histopatološkom analizom tumora, koja je danas jedina objektivna metoda za određivanje tipova tumora. Kako bi se ti navedeni dijagnostički kriteriji odredili, potrebno je provesti istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i nepromijenjenih sjemenika. Na temelju rezultata takvih istraživanja treba se provesti komparativna analiza histopatološke pretrage i pretrage metodom protočne citometrije kako bi se eventualno dobili podaci o prikladnosti protočne citometrije kao jedne od metoda za diferencijaciju tumorski promijenjenih od tumorski nepromijenjenih sjemenika te za diferencijaciju pojedinih tipova tumora.

ZAKLJUČCI

Histopatološka pretraga jest objektivna dijagnostička metoda za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa.

Iako dobiveni rezultati protočne citometrije nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, iz rezultata je vidljivo da se protočnom citometrijom na uzorcima sjemenika pasa koji su pripremljeni za histopatološku pretragu, mogu dobiti neke nove informacije o svojstvima stanice koje se mogu koristiti za diferencijaciju neoplastičnog od nepromijenjenog tkiva.

Kako bi se postavili detaljni dijagnostički kriteriji pomoću kojih bi se mogli komparirati rezultati analize protočne citometrije s histopatološkom analizom tumora, potrebno je primarno uspostaviti pouzdane protokole i standardizaciju metode protočne citometrije pomoću kojih bi se točnije mogle razlučiti karakteristike stanica i njihove genetičke osobine. Također treba provesti opsežnije istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.

Metoda protočne citometrije može pomoći u dijagnostici tumora sjemenika pasa, osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama

pretrage kao što su histopatološka analiza tumora sjemenika te ako se protokol njezina izvođenja standardizira i prilagodi analiziranom tkivu.

ZAHVALA

Zahvaljujemo Zavodu za patologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za biologiju i Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za pomoć i osiguravanje resursa za izradu ovog rada. Ovaj je rad izrađen u svrhu izrade diplomskog rada Sanje Mihoković.

LITERATURA

- COOPER G.M. (2000): The Cell: A Molecular Approach, 2nd ed. [E-book], Boston, pristupljeno preko National Center for Biotechnology Information, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> [pristupljeno 10. rujan 2015.].
- HOHŠTETER M. (2012): Poredbena patologija tumora sjemenika psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj, disertacija, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- HOHŠTETER M., B. ARTUKOVIĆ, K. SEVERIN, A. GUDAN KURILJ, A. BECK, I.C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, Ž. GRABAREVIĆ (2014): Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry, BMC Veterinary Research [Online], 10: 169.
- KENNEDY, P.C., J.M. CULLEN, J.F. EDWARDS, M.H. GOLDSCHMIDT, S. LARSEN (1998): Histo-

logical Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals, 2nd Series, WHO, Armed Forces Institute of Pathology; Washington, D.C., str. 17-18.

- MCGAVIN M.D., J.F. ZACHARY (2006): Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th ed. 1036-1038.
- NORTH S., T. BANKS, R. STRAW (2009): Tumors of the urogenital tract. U Small Animal Oncology, an introduction. Uredio North S., Banks T., Straw R., Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louise, Sydney, Toronto, Elsevier Saunders, 151-172.
- ORMEROD M.G. (2009): Flow cytometry: A basic Introduction [E-book], pristupljeno preko De Novo Software, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> [pristupljeno 10. kolovoza 2015.].
- REGGETI F., D. BIENZLE (2011): Flow Cytometry in Veterinary Oncology, Veterinary Pathology, 48, (1), 223-235.
- SAMARŽIJA D., N. ANTUNAC, T. POGAČIĆ, S. SIKORA (2004): Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protokne citometrije, Mljekarstvo, 54 (1), 39-51.
- ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN I.C., K. SEVERIN, M. HOHŠTETER, B. ARTUKOVIĆ, A. BECK, A. GUDAN KURILJ, SABOČANEC R., DŽAJA P., Ž. GRABAREVIĆ (2013): Incidence and types of Canine tumors in Croatia, Veterinarski arhiv, 83 (1), 31-45.

SUMMER SCHOOL FOR STUDENTS – ZOONOSES

23rd – 30th April 2017, Dubrovnik - Croatia



Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb

VetNEST - Veterinary Network Of European Student & Staff Transfer



Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona iz dva soja transgeničnih miševa

Differentiation of cells in a primary culture of neurons from two transgenic mouse strains



Mirić, M.^{1*}, S. Kužir², I. Alić²

Sažetak

Matične stanice mogu se diferencirati u različite vrste stanica i nailaze na široku eksperimentalnu primjenu. Iz tog su razloga istraživanja matičnih stanica u posljednjih petnaestak godina u velikom porastu. Cilj je ovog istraživanja usporedba diferencijacije neurona podrijetlom iz dvaju različitih transgeničnih sojeva miša u svrhu prikaza njihovih osobitosti za daljnju primjenu u istraživanjima matičnih stanica. U ovom je radu uzgojena primarna kultura neurona iz dvaju mišjih sojeva, ubikvitarnog GFP-LUC i Thy1-YFP. Uzgojeni neuroni analizirani su 7. i 14. dan, opisan je uzorak izražaja bjelančevina te su međusobno uspoređeni neuroni podrijetlom iz dvaju navedenih mišjih sojeva. Stanice mišjega soja GFP-LUC tijekom 7. dana diferencirale su se u potpunosti u zrele neurone i astrocite. U 100 % stanica pozitivan je GFP. U ovoj su skupini stanica biljezi neurona (MAP2, β 3-tubulin i NeuN) pozitivni u 90 % diferenciranih stanica, a biljeg astrocita (GFAP) samo u 10 % stanica. Tijekom 14. dana stanice su razvijenije, na što upućuju deblji nastavci koji su prisutni u većem broju. Biljezi neurona pozitivni su u 80 % diferenciranih stanica, a biljeg astrocita pozitivan je u 20 % stanica. Stanice mišjega soja Thy1-YFP tijekom 7. dana također su se diferencirale u zrele neurone i astrocite, međutim samo je 20 % neurona YFP-pozitivno. Kao i u GFP-LUC mišjeg soja, 7. dan diferencijacije prisutno je 90 % neurona i 10 % astrocita, a 14. dan 80 % neurona i 20 % astrocita.

Abstract

Stem cells are able to differentiate into various types of cells, and they are used in a wide range of experimental work. Therefore, stem cell research has been growing enormously over the last fifteen years. The aim of our research was to analyze the differentiation of neurons originating from two different strains of transgenic mice in order to describe their characteristics for their further use in stem cell research. In our study we cultured neurons from two mouse strains, the ubiquitous GFP-LUC and Thy1-YFP strains. The cultured neurons were analyzed on day 7 and day 14; we described the pattern of protein expression, and compared the neurons of the two strains. Cells derived from the GFP-LUC mouse strain were differentiated into neurons and astrocytes on day 7. The cells were 100% GFP positive. Out of these cells, 90% were neurons expressing neuronal markers (MAP2, β 3-tubulin and NeuN) and 10% were astrocytes expressing the astrocyte marker GFAP. On the 14th day of differentiation the cells were more developed, with thicker and more numerous processes. 80% of cells expressed neuronal markers while 20% expressed GFAP. Cells derived from the Thy1-YFP mouse strain were also differentiated on the 7th day, but only 20% of neurons were Thy1-YFP positive. On the 7th day we observed 90% neurons and 10% astrocytes in the Thy1-YFP cell culture, while on the 14th day the ratio of neurons decreased to 80% and of astrocytes it increased to 20%. A similar ratio was observed in GFP-LUC cells.

¹Mladen Mirić, dr. med. vet.,
²izv. prof. dr. sc. Snježana Kužir, dr. sc. Ivan Alić, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
miric_mladen@yahoo.com

Ključne riječi: GFP-LUC, Thy1-YFP, matične stanice, diferencijacija, biljezi neurona, biljezi astrocita

Key words: GFP-LUC, Thy1-YFP, stem cells, differentiation, neuronal markers, astrocyte marker

UVOD

U posljednjih petnaestak godina tehnologija matičnih stanica intenzivno se razvija, a istraživanja u ovom području pobuđuju velik znanstveni interes širom svijeta. Velik interes za matične stanice, bilo koje vrste, prije svega vidi se prema broju objavljenih radova od kojih se velik broj nalazi u relevantnim bazama kao što je PubMed. Budući da adekvatne terapije za većinu bolesti živčanog sustava još uvijek nema, a njega pacijenata iznimno je skupa i složena, terapija živčanim matičnim stanicama jedan je od najvećih izazova u suvremenoj neuroznanosti.

Matične stanice (engl. *stem cells*) jesu široka populacija stanica od kojih se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati različite vrste stanica. Prema osnovnoj podjeli matične se stanice mogu podijeliti na: totipotentne (zigota), pluripotentne (embrionalne matične stanice), multipotentne (npr. živčane matične stanice) (Hyttel i sur., 2010.; McGeady i sur., 2014.). Živčane matične stanice nalaze se u mozgu odraslog miša, ali i u mozgu čovjeka, i to u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (Gage, 2000.; Mitrečić i sur., 2009.; Watson i sur., 2012.).

U istraživanjima matičnih stanica veliku i nezaobilaznu ulogu imaju transgenične životinje, odnosno životinje kojima su zahvaljujući genetičkim modifikacijama „ubačene“ fluorescentne bjelančevine. Najčešća i najpoznatija takva bjelančevina jest zelena fluorescentna bjelančevina ili GFP (engl. *green fluorescent protein*), ili jedna od njegovih spektralnih varijanti: YFP (engl. *yellow fluorescent protein*), RFP (engl. *red fluorescent protein*) i CFP (engl. *cyan fluorescent protein*). U literaturi su opisane brojne modifikacije miševa, no najčešće se radi ili o ubikvitarno pozitivnim životinjama, što znači da sve stanice u tijelu izražavaju zelenu fluorescentnu bjelančevinu, ili o drugoj varijanti kod koje se fluorescentna bjelančevina izražava preko određenog gena i pozitivne su samo određene stanice. U ovom su istraživanju korištena dva mišja soja, ubikvitarni GFP-LUC i Thy1-YFP soj.

GFP-LUC mišji soj razmjerno je nov soj, na kojemu još nema niti jedna publikacija. Na sličnim GFP sojevima napravljena su istraživanja poput onoga Koniga i suradnika (2014.), u kojemu je praćena diferencijacija transplantiranih GFP stanica nakon ozljede spinalnog ganglija ili

su GFP stanice štakora korištene za intravaskularnu transplantaciju na modelu amiotrofične lateroskleroze pri čemu su uspješno prošle kroz krvno-moždanu barijeru i ugradile se u mozak domaćina (Mitrečić i sur., 2010.; Mitrečić, 2011.).

Thy1-YFP mišji soj postoji već šesnaest godina (Feng i sur., 2000.), a obilježava ga izražaj fluorescentne bjelančevine pomoću promotora Thy1-gena. Fluorescencija je visokospecifična isključivo za neurone i niti jedna druga stanica nije pozitivna. Iako je ova skupina autora napravila čak 25 sojeva ovoga miša, zanimljivo je da svi imaju različit uzorak fluorescencije i obilježavaju različitu populaciju neurona. Thy1-YFP pozitivne stanice izražavaju fluorescentnu bjelančevinu u svim svojim dijelovima stanice, uključujući: jezgru, perikarion, nastavke (akson i dendriti), čak i spine. Prvi opis soja publiciraju Feng i sur., 2000. te Keller-Peck i sur., 2001., koji su najveći dio istraživanja napravili na dva soja (YFP-H i GFP-S) te tijekom prva dva tjedna postnatalnog života (Porrero i sur., 2010.). Carter i suradnici (2008.) opisali su degenerativne promjene i oporavak koji se zbivaju nakon ozljede kralježnične moždine, dok je druga skupina autora opisala važnost soja u istraživanjima tumora, upalama kao i u cijeljenju rana (Josvay i sur., 2014.). Velika prednost ovoga soja jest vidljiv izražaj YFP u jezgri, ali i u citoplazmi neurona, što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (Bannerman i sur., 2005.; Wang i sur., 2006.). Na taj način omogućuje preciznu analizu izražaja bjelančevine u svim dijelovima stanice. Detaljna analiza diferencijacije živčanih matičnih stanica Thy1-YFP soja tijekom diferencijacije *in vitro*, tijekom embrionalnog razvoja i nakon transplantacije u mozak miša zahvaćen moždanim udarom opisana je u ranijim istraživanjima Laboratorija za matične stanice (Alić, 2015.; Alić i sur., 2016.). Nadalje, na istom je soju napravljena i analiza izražaja gena tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica pomoću RT-PCR (Stojanac, 2016.).

Glavni cilj ovoga istraživanja bio je napraviti primarnu kulturu neurona podrijetlom iz dvaju mišjih sojeva, opisati uzorak izražaja bjelančevina te ih međusobno usporediti. Budući da se radi o razmjerno novim mišjim sojevima, primarna kultura neurona na ovim sojevima do sada još nije napravljena.

MATERIJALI I METODE

Životinje

Za potrebe ovoga istraživanja korištene su dvije gravidne ženke, podrijetlom iz dvaju različitih mišjih sojeva: ubikvitarni GFP-LUC (izražava GFP u svim stanicama) i Thy1 (izražava YFP u određenim neuronima). Životinje su smještene u nastambi za životinje pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Istraživanje je napravljeno u Laboratoriju za matične stanice, a odobreno je rješenjima Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (ur. broj: 04-77/2010-238) i Veterinarskoga fakulteta (ur. broj: 251-61-01/139-16-2) Sveučilišta u Zagrebu.

Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korištene su ženke koje su bile gravidne 17,5 dana. Takve su ženke žrtvovane cervikalnom dislokacijom te su im izolirani gravidni rogovi maternice. Od tog se trenutka proces izolacije živčanih matičnih stanica nastavio u sterilnim uvjetima, u staničnoj kulturi. Izolirani gravidni rogovi prebačeni su u sterilnu Petrijevu posudu s HBSS puferom (Gibco). Zametak je odvojen od ovojnice, nakon čega je napravljena dekapitacija te je krajnji mozak (*telencephalon*) pažljivo odvojen. Krajnji mozgovi od 10 zametaka mehanički su usitnjeni škaricama i premješteni u sterilnu tubu (BD Falcon, 50 mL). Kako bi se nastalo usitnjeno tkivo proteolitički razgradilo i kako bi se dobila suspenzija stanica, dodano je 5 mL akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies, A11105-01) tijekom 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Tkivo je dodatno usitnjeno mehaničkim provlačenjem kroz nastavak za pipetu tijekom tih 20 minuta. Stanična suspenzija je nakon 20 minuta prebačena u novu tubu i na nju je dodana ista količina medija kako bi se akutaza deaktivirala. Osim toga, cijela je tuba stavljena na centrifugu nabrzinu od 300 g tijekom 6 minuta, na temperaturu od 21 °C. Nakon centrifugiranja potreban je samo talog, stoga se tekući dio uklonio. Stanice su međusobno odvojene i oslobođene komadića tkiva koje je zaostalo, pa je iz tog razloga na talog dodano 2 mL medija. U međuvremenu je, prema broju stanica, pripremljen medij u kojemu su stanice nasadene na podloge. Stanice su

nasadene u mediju (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+Glu-taMAX™-I, Gibco by life Technologies, 31331-028) u koji je dodan B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies, 17504-044), Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies, 15070-063) i N-2 (N-2 Supplement (100x). Stanice su uzgajane u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i 5 % CO₂.

Priprema podloga za diferencijaciju stanica

Podloga za diferencijaciju stanica, odnosno stakla (engl. *cover slips*) promjera 12 mm, pripremana je 4 – 5 dana. Prvo su stakla ostavljena preko noći u dušičnoj kiselini, nakon čega su ispirana sterilnom vodom tijekom dva sata. Nakon ispiranja ostavljena su 24 sata u 70 %-tnom alkoholu. Sljedećeg su dana stakla sterilizirana na temperaturi od 250 °C tijekom 12 sati. Nakon sterilizacije, na stakla je stavljeno 130 µL Poly-D-lizina u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA, P6407-5MG) tijekom 24 sata. Poly-D-lizin isprane sterilnom vodom, a stakla su premještena u ploče za diferencijaciju (engl. *24 well plate*) te je na njih stavljeno 400 µL laminina u koncentraciji 10 µg/mL (*Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane*, SIGMA, L2020-1MG) tijekom 24 sata. Nakon toga je laminin dva puta ispran svježim medijem i tada su stakla bila spremna za diferencijaciju stanica.

Nasađivanje, diferencijacija i fiksacija stanica

Stanice su nasadene u koncentraciji od 200 do 250 000 stanica po jednom staklu. Budući da su za potrebe ovoga istraživanja korištene primarne kulture neurona, stanice su neposredno nakon izolacije nasadene na prethodno pripremljene podloge. Nakon nasađivanja stanice su stavljene na diferencijaciju u inkubator. Stanicama je nakon 24 sata promijenjen medij, kako bi se podržao rast i diferencijacija neurona. Za primarne kulture u Laboratoriju za matične stanice standardno se rabi tzv. kondicionirani medij. Kondicionirani medij dobiven je tako da se Neurobasal medij, u koji su dodani čimbenici i antibiotik, stavi na uzgojene astrocite. Nakon 24 sata medij je pokupljen s astrocita, profiltriran i dodan na neurone. Kondicionirani medij služi kako bi potaknuo rast neurona, budući da su

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
Doublecortin	kunić	1:200	Cell Signaling (#4606)
GFAP	pile	1:250	Abcam (ab4674)
GFP	pile	1:500	Molecular probes (A10262)
MAP2	pile	1:1000	Abcam (ab5392)
NeuN	miš	1:200	Millipore (MAB377)
β3-tubulin	kunić	1:200	Cell Signaling (D71G9)

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti – pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 488 koza anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11084)
Alexa Fluor 488 koza anti – pile IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A11039)
Alexa Fluor 488 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti – miš IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21202)
Alexa Fluor 546 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 647 magarac anti – kunić IgG (H+L)	1:1000	Invitrogen (A21002)

astrociti u njega izlučili svoje produkte koji se fiziološki nalaze u živčanom tkivu. Stanice su za potrebe ovoga istraživanja uzgajane u dvije vremenske točke (7 i 14 dana) kako bismo dobili potpuno diferencirane neurone. Nakon 7 i 14 dana stanice su fiksirane 4 %-tnim paraformaldehidom tijekom 15 minuta te su isprane PBS (engl. *Phosphate buffer saline*) puferom i ostavljene na +4 °C do bojanja.

Imunocitokemija

Fiksirane su stanice tri puta po pet minuta ispirane PBS-om, nakon čega im je dodano 500 μL otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2 % triton X-100 (Sigma, T8787-100ML) u PBS-u + 3 % kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela traje 60 minuta. Zatim je stanicama dodano 85 μL otopine primarnog protutijela

(0,2 % triton X-100 u PBS-u + 1 % kozjeg seruma + primarno protutijelo) i to je ostavljeno preko noći u hladnjaku na +4 °C. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u tablici 1.

Sljedeći dan primarna protutijela isprana su tri puta po pet minuta PBS-om, poslije čega je na stanice stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u + sekundarno protutijelo). Popis sekundarnih protutijela korištenih u ovom istraživanju prikazan je u tablici 2. Inkubacija sekundarnim protutijelima zbiva se na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji tijekom dva sata. Nakon toga su sekundarna protutijela ispirana istim postupkom kao i primarna te se na stanice stavlja DAPI, fluorescentna boja za jezgre, u koncentraciji 1:8000. DAPI je ispran nakon deset minuta, i to jednako kao primarna i sekundarna protutije-

la, odnosno tri puta po pet minuta. Nakon što je DAPI ispran, stanice su poklopljene medijem za fluorescentno poklapanje (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Poklopljeni su preparati ostavljeni na sušenju u hladnjaku na +4 °C i bili su spremni za mikroskopiranje na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

Prebrojavanje stanica

Broj obojenih stanica određen je nakon slikanja preparata konfokalnim mikroskopom (Zeiss LSM 510 Meta) na deset vidnih polja. Za kvantifikaciju stanica *in vitro* korištene su stanice obaju mišjih sojeva u vremenskim točkama od 7 i 14 dana. Kvantifikacija je rađena kako bi se odredio broj Thy1 pozitivnih stanica, broj neurona i astrocita u primarnoj kulturi neurona. Prebrojavanje je napravljeno od strane dvaju neovisnih istraživača, a rezultati prebrojavanja poklapali su se u 100 % slučajeva.

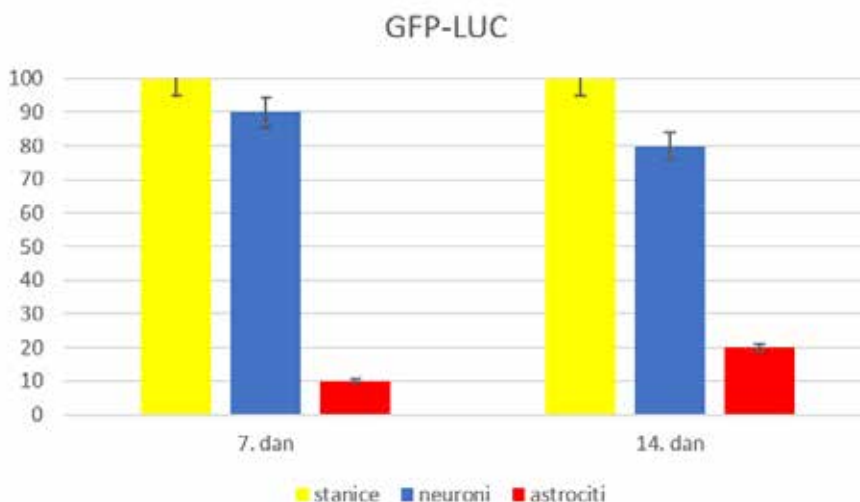
REZULTATI

Diferencijacija GFP-LUC stanica

Tijekom sedmog dana diferencijacije stanice podrijetlom od GFP-LUC mišjeg soja u potpunosti su se diferencirale u zrele, razgranate neurone i astrocite. Budući da su stanice podrijetlom od ubikvitarnog mišjeg soja, sve stanice, neuroni i astrociti, GFP su pozitivne (slika 1 A-C, zeleno). Osim GFP-a, koji je pozitivan u 100 % diferenciranih stanica, napravljeno je bo-

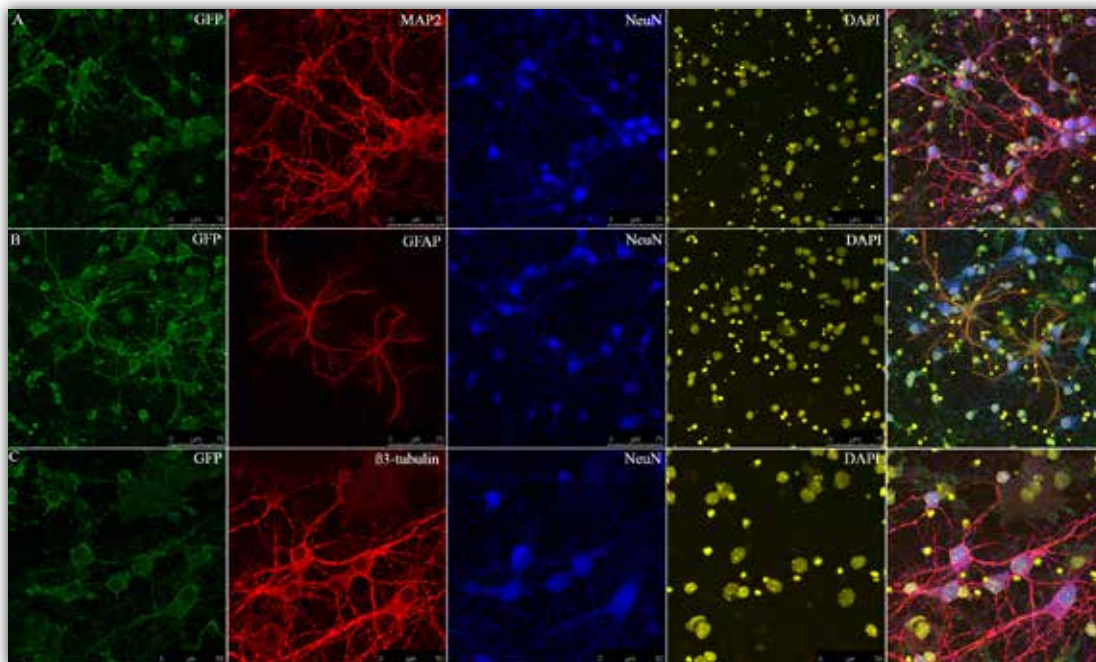
jenje stanica na tipične biljege neurona (MAP2, β 3-tubulin i NeuN) te za astrocite (GFAP). Tipični citoplazmatski biljezi neurona (MAP2 i β 3-tubulin) pozitivni su u 90 % diferenciranih stanica (grafikon 1) i jasno su pozitivni u perikarionu i nastavcima neurona (slika 1A i C, crveno). Treći biljeg neurona NeuN (slika 1A-C, plavo) koji je specifičan za jezgru neurona, također boji 90 % stanica, ali osim u jezgrama, NeuN je u potpuno diferenciranim stanicama pozitivan i u nastavcima. Pozitivnost NeuN-a u nastavcima očituje se kao granulirani signal koji je izražen gotovo čitavom dužinom nastavaka. Na stopljenim slikama jasno se vidi da se sva tri biljega neurona u potpunosti podudaraju sa signalom GFP-a. Svega je 10 % (grafikon 1) stanica diferencirano u astrocite i GFAP je pozitivno te također pokazuje kolokalizaciju s GFP-om (slika 1B, crveno).

Tijekom četrnaestog dana diferencijacije stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. U ovoj vremenskoj točki govorimo o potpuno zreloj primarnoj kulturi mišjih neurona. Ukupan broj stanica u kulturi manji je zbog prirodnog odumiranja stanica *in vitro*, ali su one izrazito diferenciranije i zrelije. Neurona u staničnoj kulturi ima 80 % od ukupnog broja prebrojenih stanica (grafikon 1) i u potpunosti kolokaliziraju s MAP2 (slika 2A, crveno), β 3-tubulinom (slika 2C, crveno) i NeuN-om (slika 2A-C, plavo). Zrelost neurona najbolje se vidi na snažnom izražaju NeuN-a čija je citoplazmatska

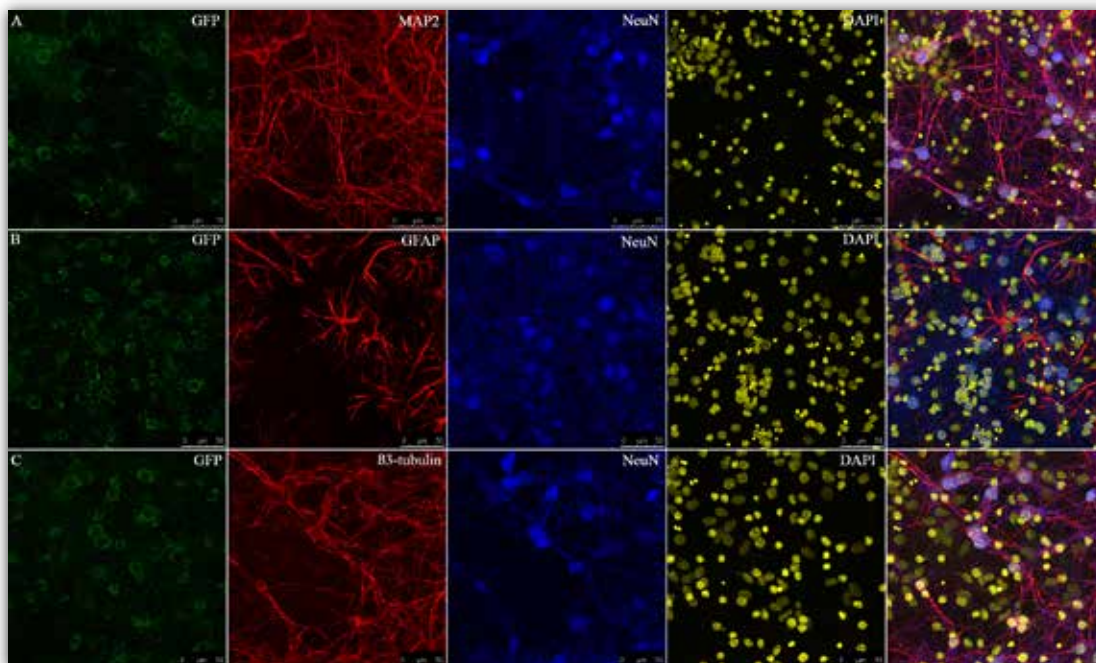


Grafikon 1. Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku.

Slika 1. Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s β 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



Slika 2. Imunocitokemija GFP-LUC stanica (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje GFAP-om (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje β 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



granularnost neusporedivo veća nego u prethodnoj vremenskoj točki. Budući da se astrociti sporije diferenciraju, ali i zbog odumiranja pojedinih neurona u ovoj vremenskoj točki nalazi se veći broj GFAP-pozitivnih stanica i iznosi 20 % (grafikon 1) od ukupnog broja prebrojenih stanica (slika 2B, crveno).

Kao negativna kontrola bojenja stanica na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki stavljena je samo otopina sekundarnih protutijela.

Budući da nije bilo primarnih protutijela, sekundarna se protutijela nisu imala na što vezati te na ovim preparatima nije vidljiv nikakav signal (nije prikazano).

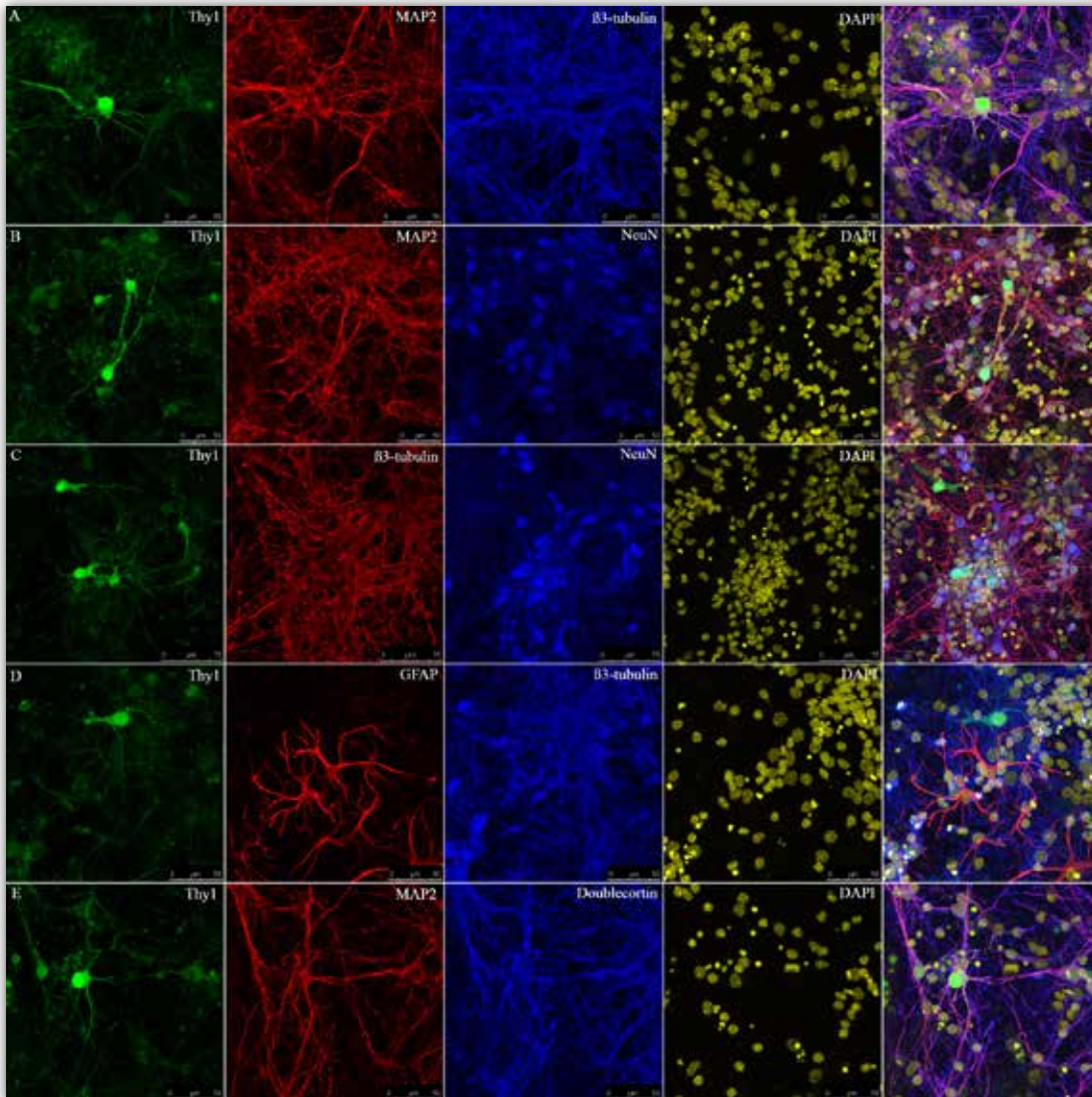
Diferencijacija stanica *Thy1*

Tijekom sedmog dana diferencijacije stanice podrijetlom od mišjeg soja *Thy1-YFP* u potpunosti su se diferencirale u zrele neurone i astrocite. Budući da ovaj mišji soj ne izražava

ubikvitarno GFP, već samo u određenom postotku neurona, prebrojavanjem stanica vidljivo je da svega 20 % neurona izražava GFP, odnosno njegovu varijantu YFP (slika 3A-E, zeleno). Osim ovoga biljega neurona, čija se fluorescencija izražava bez imunocitokemije, na stanicama je napravljena imunocitokemija kako bi se odredila kolokalizacija s biljezima neurona (MAP2, β 3-tubulin, NeuN i Doublecortin) te astrocita (GFAP). Sve Thy1-pozitivne stanice kolokaliziraju s tipičnim biljezima neurona: MAP2 (slika 3A, B i E, crveno), β 3-tubulin (slika 3A, plavo, C, crveno i D, plavo), NeuN (slika 3B i C, plavo) te Doublecortin (slika 3E, plavo). Niti jedna Thy1-pozitivna stanica nije GFAP-pozitivna, odnosno izražaj Thy1 specifičan je za neurone. Na

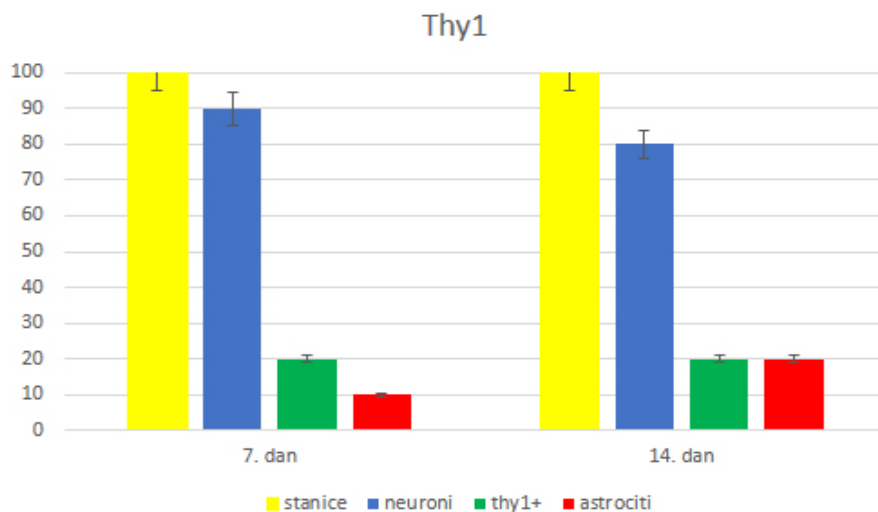
stopljenim slikama (slika 3A-E) vidi se potpuna kolokalizacija Thy1 s biljezima neurona (ljubičasto), dok su astrociti crveni. Prebrojavanjem diferenciranih stanica u ovoj vremenskoj točki vidljivo je da je u kulturi prisutno 90 % neurona i 10 % astrocita. Od ukupnog broja neurona njih je 20 % Thy1-pozitivno (grafikon 2).

Tijekom četrnaestog dana diferencijacije stanice su znatno razvijenije nego u prethodnoj vremenskoj točki. Kao i kod prethodnog mišjeg soja, razvijenost, odnosno zrelost stanica očituje se u većem broju i debljini samih nastavaka. I u ovih je stanica ukupan broj stanica po vidnom polju nešto manji, ali i ovdje zbog načina uzgoja stanica prevladavaju neuroni (80 %), od kojih je 20 % Thy1-pozitivno, a udio astrocita iznosi

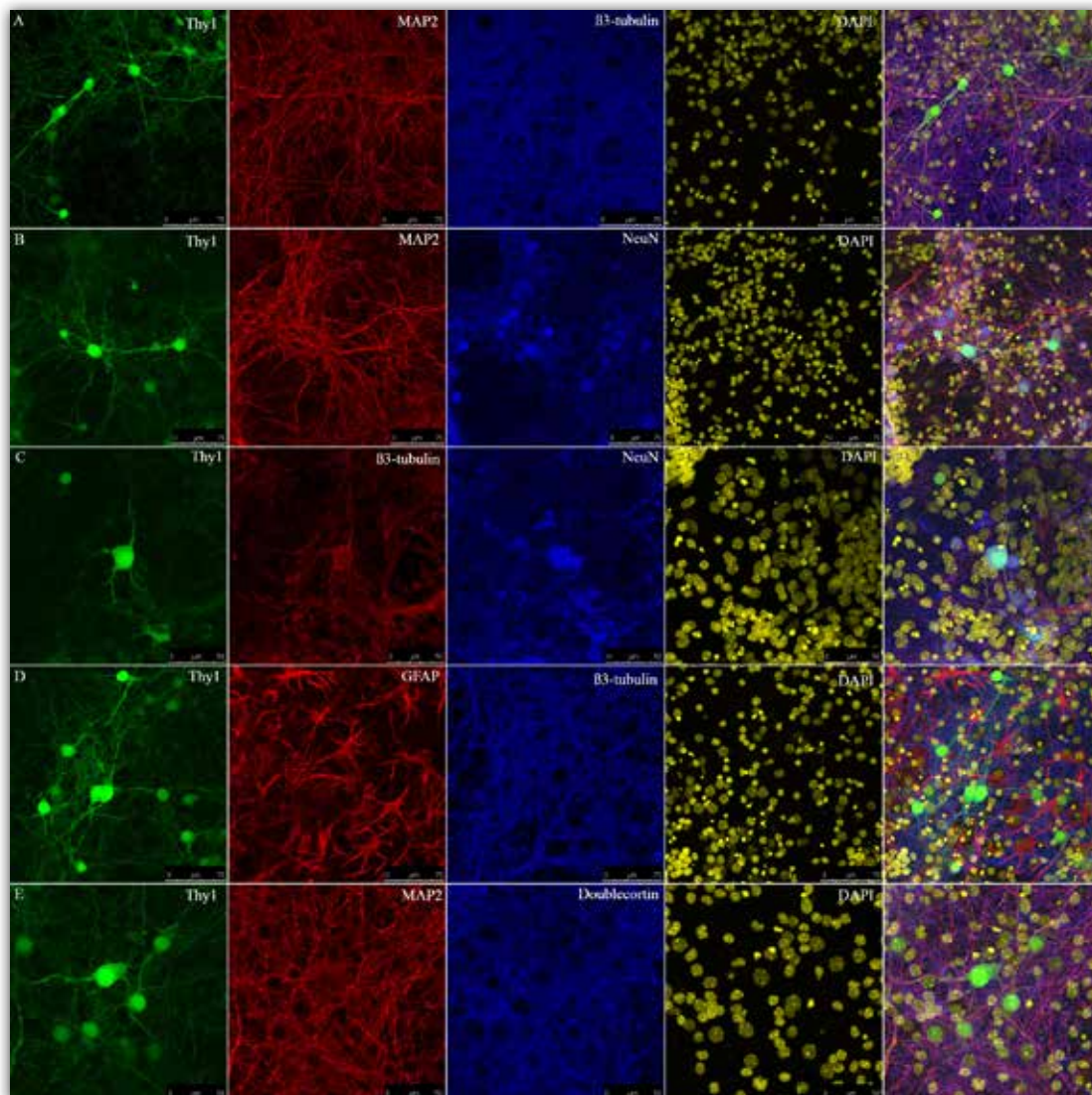


Slika 3. Imunocitokemija stanica Thy1 (zeleno) tijekom 7. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), β 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s β 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika D. Bojenje s GFAP-om (crveno), β 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika E. Bojenje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.

Grafikon 2. Prebrojavanjem ukupnog broja stanica na deset vidnih polja određen je broj neurona, Thy1-pozitivnih neurona i astrocita tijekom diferencijacije stanica u primarnoj kulturi neurona. Na osi X prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica, dok je na osi Y prikazan broj stanica izražen u postotku.



Slika 4. Imunocitokemija stanica Thy1 (zeleno) tijekom 14. dana diferencijacije. Slika A. Bojenje s MAP2 (crveno), β 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika B. Bojenje s MAP2 (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika C. Bojenje s β 3-tubulinom (crveno), NeuN (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika D. Bojenje GFAP-om (crveno), β 3-tubulinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika. Slika E. Bojenje s MAP2 (crveno), Doublecortinom (plavo), DAPI (žuto) i stopljena slika.



također 20 % (grafikon 2). Na slici 4 prikazane su stanice obojene biljezima neurona i astrocита. Osim imunohistokemije na svim su slikama obojene i jezgre DAPI bojom (žuto).

Zanimljiva je velika pozitivnost Doublecortina (slika 3 i 4E, plavo) za koji iz literature znamo da je biljeg mladih neurona, odnosno neurona u nastanku. Ovakvim načinom uzgoja stanica i u ovim uvjetima Doublecortin je pozitivan u objema vremenskim točkama i u potpunosti kolokalizira s Thy1 i drugim biljezima neurona, što se jasno vidi na stolpljenim slikama (slika 3 i 4E, ljubičasto).

Kao negativna kontrola bojanja stanica, na jedno staklo u svakoj vremenskoj točki stavljena je samo otopina sekundarnih protutijela. Budući da za Thy1 nije potrebno protutijelo, na ovim su preparatima vidljive samo Thy1 (zele- ne) stanice (nije prikazano).

RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja napravljena je primarna kultura neurona podrijetlom od dvaju mišjih sojeva, GFP-LUC i Thy1-YFP. Stanice su neposredno nakon izolacije nasadene na prethodno pripremljene podloge te su stavljene na diferencijaciju tijekom četrnaest dana kako bi se odredio broj diferenciranih stanica, uzorak izražaja fluorescentne bjelančevine te međusobno usporedile stanice podrijetlom od ovih dvaju sojeva.

Budući da se radi o stanicama u primarnoj kulturi neurona, stanice su uzgajane tjedan dana dulje nego što se diferenciraju živčane matične stanice u Laboratoriju za matične stanice. Stanice podrijetlom iz GFP-LUC soja 100 % su pozitivne budući da je GFP ubikvitarno „ubačen“ u blastocistu miša. Sve su stanice pozitivne, odnosno zelene. Za vizualizaciju ovog biljega potrebno je protutijelo, što je uobičajeno kod ubikvitarnih GFP mišjih sojeva. Opisujući kulturu stanica GFP je citoplazmatski biljeg, koji je intenzivno pozitivan u čitavoj citoplazmi perikariona i nastavaka, dok jezgra nije pozitivna. Nadalje, razlikuje se citoplazmatska obojenost neurona i astrocита, dok se u neuronima vidi granularna pozitivnost, astrociti su zagasito zelene boje i signal je ujednačen, odnosno nema granulacije kakva je opisana u neurona. Stanice podrijetlom iz ovoga soja potpuno su se

diferencirale za sedam dana, a nakon četrnaest dana dosežu svoj maksimalni diferencijacijski potencijal. Stanice pokazuju kolokalizaciju sa svim neuronskim biljezima kao i glije.

Stanice Thy1-YFP također su se potpuno diferencirale već sa sedam dana te su kao i stanice GFP-LUC dosegnule svoj maksimum četrnaestog dana. Za razliku od GFP, za Thy1 nije potrebno protutijelo, ovaj je biljeg pozitivan u čitavoj stanici, uključujući perikarion s jezgrom, nastavcima, čak i spinama. Na temelju broja spina i položaja na nastavcima određuje se sinaptička aktivnost, odnosno funkcionalna uloga neurona, međusobno, ali i sa stanicama glije (Vukšić i sur., 2008.). No, za razliku od GFP-a, Thy1 je pozitivan samo u određenom broju neurona, i to u svega 20 % stanica. Ovaj je broj stalan i ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica.

Iako je način uzgoja i diferencijacije ovih stanica prilagođen neuronima, i zapravo pogoduje razvoju neurona, ipak se u kulturi tijekom sedmoga dana nalazi 10 % astrocита (GFAP-pozitivnih stanica) dok je četrnaestog dana taj udio porastao na 20 %. Razmjerno velik postotak astrocита može se objasniti na tri načina: astrociti se znatno sporije diferenciraju tijekom embrionalnog razvoja pa im i u *in vitro* uvjetima treba više vremena da bi postigli svoju pozitivnost, drugi je uzrok taj što su stanice izolirane iz starijih zametaka i odmah nasadene te je u startu bilo više progenitora glije i, konačno, odumiranjem neurona i starenjem kulture aktiviraju se glija-stanice koje imaju ulogu čistača i na taj način dolaze do izražaja. Iako ovi rezultati pokazuju znatno veći udio astrocита u odnosu na prethodna istraživanja na živčanim matičnim stanicama (Alić i sur., 2016.; Stojanac, 2016.), rezultati ovog istraživanja svojevrsan su nastavak i nadogradnja postojećih rezultata budući da je analiza napravljena na primarnoj kulturi stanica. U svom istraživanju Stojanac (2016.) opisuje izražaj GFAP-a već treći dan diferencijacije na razini izražaja gena, dok su imunocitokemijski prve stanice vidljive tek peti dana diferencijacije. Rezultat ovog istraživanja pokazuje da su i progenitori GFAP pozitivni, odnosno razina nukleinskih kiselina u stanici dovoljna je da bi se mogla očitati, ali da bi se stvorila bjelančevina vizualizirana s protutijelima, potrebna su još dva dana diferencijacije. Iako je

materijal iz kojega su izolirani primarni neuro-ni stariji, odnosno zreliji tri dana od prethodnih istraživanja, sedmi dan diferencijacije u kulturi se nalazi samo 5 % više astrocita u odnosu na živčane matične stanice.

U ovom su istraživanju zapažena i opisana dva neočekivana nalaza. Stanice podrijetlom od obaju sojeva pozitivne su i kolokaliziraju 100 % s neuronskim biljezima. No, NeuN, za koji iz dostupne literature znamo da boji jezgu stanice (engl. *neuron nuclei*), u ovih je, zrelih stanica, granulirano obojio i nastavke neurona. Posebno do izražaja dolazi četrnaesti dan kad njegov izražaj gotovo podsjeća na druge citoplazmat-ske biljege. Drugi je biljeg Doublecortin koji je obojio sve stanice, zrele i manje zrele. Za Doublecortin se također zna da boji samo mlade, novonastale, uglavnom bipolarne neurone. U ovim uvjetima uzgoja, Doublecortin je pozitivan u potpuno zrelim stanicama i potpuno kolokali-zira s Thy1 i drugim biljezima neurona.

ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju Laboratorija za matične stanice u kojemu je provedeno istraživanje za potrebe diplomskog rada. Istraživanje je povedeno u sklopu projekta „Mladi mozak“ financiranom od Europske unije.

LITERATURA

- ALIĆ, I. (2015): Morfološka analiza nastanka i diferencijacije neurona u staničnoj kulturi, tijekom razvoja zametka i nakon transplantacije u mozak miša korištenjem matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja THY1 YFP-16. Disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- ALIĆ, I., N. KOSI, K. KAPURALIN, D. GORUP, S. GAJOVIĆ, R. POCHET, D. MITREČIĆ (2016): Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neuroscience letters* 634, 32–41.
- BANNERMAN, P. G., A. HAHN, S. RAMIREZ, M. MORLEY, C. BÖNNEMANN, S. YU, G.-X. ZHANG, A. ROSTAMI, D. PLEASURE (2005): Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128, 1877–1886.
- CARTER, L. M., M. L. STARKEY, S. F. AKRIMI, M. DAVIES, S. B. MCMAHON. E. J. BRADBURY (2008). The Yellow Fluorescent Protein (YFP-H) mouse reveals neuroprotection as a novel mechanism underlying chondroitinase ABC-mediated repair after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28,14107–14120.
- FENG, G., R. H. MELLOR, M. BERNSTEIN, C. KELLER-PECK, Q. T. NGUYEN, M. WALLACE, J. M. NERBONNE, J. W. LICHTMAN, J. R. SANES (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51.
- GAGE, F. H. (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- JOSVAY, K., Z. WINTER, R. KATONA, L. PECZEL, A. MARTON, A. BUHALA, G. SZAKONYI, Z. OLAH, C. VIZLER (2014): Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep06776.
- HYTTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): *Essentials of domestic animal embryology*. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. str. 23–56.
- KELLER-PECK, C., M. K. WALSH, W. B. GAN, G. FENG, J. R. SANES, J. W. LICHTMAN (2001): Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: Studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31, 381–394.
- KONIG, N., C. TROLLE, K. KAPURALIN, I. ADAMEYKO, D. MITREČIĆ, H. ALDSKOGIUS, P. J. SHORLAND, E. N. KOZLOVA (2014): Murine neural crest stem cells and embryonic stem cell-derived neuron precursors survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1893.
- MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2009): Toward the treatments with neural stem cells: experiences from amyotrophic lateral sclerosis. *Anat. Rec.* 292, 1962–1967.
- MITREČIĆ, D., C. NICAISE, S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2010): Distribution, differentiation, and survival of intravenously administered neural stem cells in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Transplant.* 19, 537–548.

- MITREČIĆ, D. (2011): Current advances in intra-vascular administration of stem cells for neurological diseases: a new dose of rejuvenation injected. *Rejuvenation Res.* 5, 1–3.
- MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. *Naklada Slap.* Zagreb. 1–30.
- PORRERO, C., P. RUBIO-GARRIDO, C. AVENDAÑO, F. CLASCÁ (2010): Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* 1345, 59–72.
- STOJANAC, A. (2016): Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona. *Studentski znanstveni rad.* Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
- VUKŠIĆ, M., D. DEL-TURCO, C. B. ORTH, G. J. BURBACH, G. FENG, C. M. SCHWARZACHER, W. STEPHAN. T. DELLER (2008): 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus* 18, 364–375.
- WANG, Y., J. ZHANG, S. MORI, J. NATHANS (2006): Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 Knock-Out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J. Neurosci.* 26, 355–364.
- WATSON, C., G. PAXINOS, L. PUELLES (2012): *The mouse nervous system.* Elsevir. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. str. 16-45.

42ND WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS AND FECAVA 23RD EUROCONGRESS

25-28 September, 2017
Copenhagen, Denmark

www.wsava2017.com





¹ Sara Došen, Marija
Elena Husić, studentica,
Veterinarski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
² prof. dr. sc. Tajana Trbojević
Vukičević, izv. prof. dr. sc.
Martina Đuras, Zavod za
anatomiju, histologiju i
embriologiju, Veterinarski
fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
saradoen@gmail.com
melena.husic@gmail.com

Prikaz koronarnih arterija ovce na anatomskom preparatu srca primjenom poliuretanske smjese

Coronary arteries of sheep prepared with application of a polyurethane mixture

Došen, S.¹*, M. E. Husić¹*, T. Trbojević Vukičević², M. Đuras²

Sažetak

Dijagnostika bolesti koronarnih arterija i primjena odgovarajuće terapije u porastu je u veterinarskoj medicini. U svrhu ispravnog pristupa bolestima koronarnih arterija nužno je prethodno znanje o njihovoj anatomskoj građi, posebno položaju i grananju. Tijekom anatomske sekcije srca, položaj i grananje koronarnih arterija teško je proučiti ako prethodno nisu ispunjene određenim punilom. U svrhu boljeg prikaza ogranaka koronarnih arterija u njihov smu lumen injektirali smjesu poliuretanskog laka i crvenog praškastog pigmenta. Nakon sekcije koronarnih arterija opisali smo njihovo grananje na modelu ovce i uočili odstupanja od opisa u literaturi te ističemo važnost poznavanja anatomskih varijacija među vrstama, ali i među jedinkama iste vrste.

Abstract

Diagnosis and therapy of coronary artery diseases are receiving increasing attention in veterinary medicine. Knowledge about the position and branching of coronary arteries is necessary for a correct medical approach. The anatomy of the coronary arteries is easily studied in hearts previously filled with a specific mixture. In order to gain better insight into the branches of the coronary arteries we injected a mixture of polyurethane varnish and a red powdered pigment into their lumen. After dissection we described the branches of the coronary arteries in the heart of a sheep. We recorded differences from the descriptions in the literature. Due to our findings we would like to emphasize the importance of knowledge of anatomical variations between species, and between specimens of the same species.

UVOD

Srce je središnji organ krvožilnog sustava, a poznavanje njegove građe i funkcije osnova je primjene brojnih dijagnostičkih i terapijskih metoda u humanoj i veterinarskoj medicini. Od iznimne je važnosti poznavanje makroskopske građe srca, uključujući položaj i fiziološku veličinu srca, vanjski oblik srca, sustav srčanih šupljina, građu srčane stijenke te krvnih i limfnih

žila i živaca srca (König i Liebich, 2009.). Srce se nalazi u prsnoj šupljini (*cavum pectoris*) i zauzima središnji dio sredoprjsa (*mediastinum*) smještenog između lijeve i desne pleuralne šupljine (*cavum pleurae dextrum* i *cavum pleurae sinistrum*). Oblikom srce nalikuje na stožac s bazom (*basis cordis*) smještenom dorzalno u visini horizontalne ravnine koja prolazi sredinom prsnoga koša i vrhom (*apex cordis*) usmjerenim ventralno blizu ošita. Sustav srčanih šupljina

Ključne riječi: koronarne arterije, ovca, poliuretanski lak

Key words: coronary arteries, sheep, polyurethane mixture

sastoji se od desne i lijeve pretkljetke (*atrium dextrum* i *atrium sinistrum*) te desne i lijeve kljetke (*ventriculus dexter* i *ventriculus sinister*) (slika 1A) koje su međusobno odvojene unutar-njim uzdužnim pregradama (*septum interven-triculare* i *septum interatriale*). Srčanu stijenku grade tri sloja (endokard, miokard i epikard) od kojih je srednji, zvan još i srčani mišić, najdeblji (König i Liebich, 2009.).

Pravilan rad srčanog mišića omogućuje dobra opskrbljenost krvlju koju pružaju krvne žile srca (*arteriae et venae cordis*). One čine tzv. nutritivni krvotok srca, a to su *a. coronaria sinistra* i *a. coronaria dextra* s granama, *sinus coronarius* s pritocima, *vv. cordis dextrae* i *vv. cordis minimae* (*International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature*, 2012.). Koronarne arterije (*a. coronaria sinistra* i *a. coronaria dextra*) položene su ispod površinskog sloja stijenke srca (subepikardijalno) i uloga im je stalna optimalna opskrba srčanog mišića kisikom i hranjivim tvarima. Oko koronarnih arterija, također ispod epikarda, nalazi se različita količina masnoga tkiva koja poravnava vanjsku površinu srca i tako olakšava kretanje srca unutar osrčja (*pericardium*). Koronarne arterije naziv su dobile prema položaju njihovih glavnih debela u kružnom žlijebu, tzv. koronarnoj brazdi (*sulcus coronarius*) koja se nalazi na vanjskoj površini srca, u ravnini granice između pretkljetki i kljetki. Razlikujemo lijevu i desnu koronarnu arteriju te njihove grane čiji je raspored različit među vrstama, ali i jedinkama iste vrste (Fanghänel i sur., 2009.; König i Liebich, 2009.).

Dijagnostika bolesti koronarnih arterija u veterinarskoj medicini obavlja se u manjem opsegu nego u humanoj medicini, no ovca i pas eksperimentalni su modeli za kardiovaskularne kirurške tehnike (Shofti i sur., 2004.; Noestelthaller i sur. 2007.). U svrhu ispravnog pristupa bolestima koronarnih arterija nužno je detaljno poznavanje njihove anatomske građe, posebno položaja i grananja. Anatomske opis koronarnih arterija domaćih životinja u postojećoj literaturi ne uključuje u dovoljnoj mjeri anatomske varijacije među vrstama, ali ni među jedinkama iste vrste. Cilj je našeg istraživanja detaljan opis grananja koronarnih arterija na modelu ovce. Naši su rezultati preliminarni, a istraživanje će se proširiti na razne vrste domaćih i divljih ži-

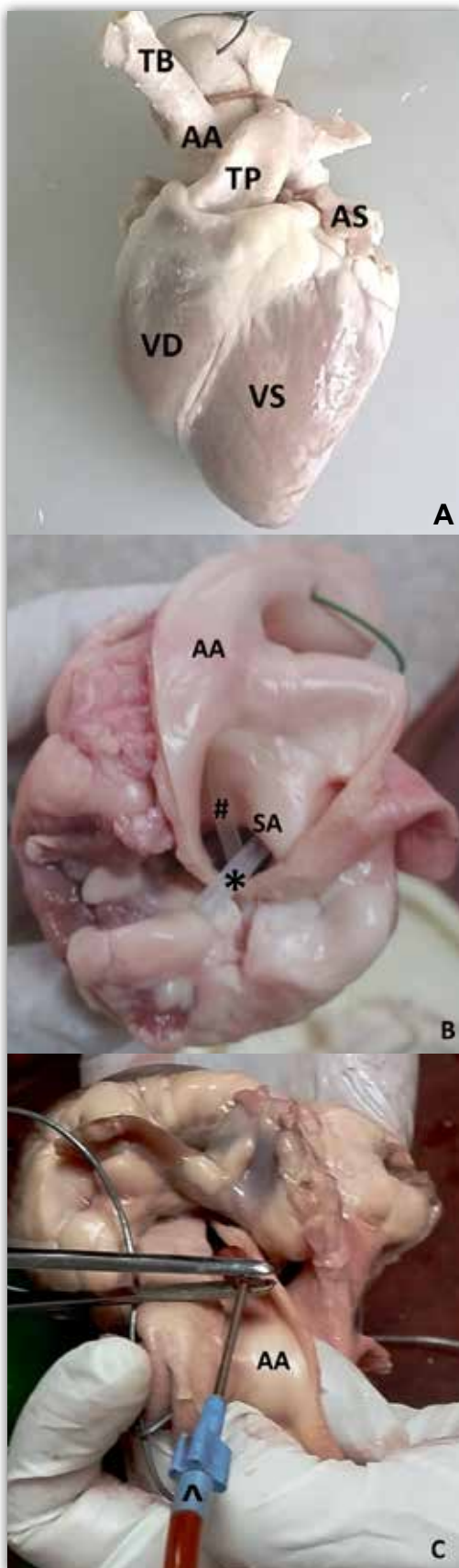
votinja u svrhu povećanja znanja o anatomske raznolikosti koronarnih arterija.

MATERIJALI I METODE

U svrhu ovog istraživanja jedno srce ovce pripremljeno je u skladu s metodom za prikaz koronarnih arterija i njihovih ogranaka pomoću poliuretanske smjese i crvenog pigmenta (Chirilean i sur., 2010.). Smjesa korištena za prikaz koronarnih arterija priređena je od dvokomponentnog poliuretanskog laka za drvo (Chromoden), učvršćivača za lak i praškastog crvenog pigmenta za beton (Barvit). Dvokomponentni poliuretanski lak i učvršćivač pomiješani su u omjeru 1 : 1, te je dodan crveni pigment kako bi prozirna poliuretanska smjesa poprimila dobro vidljivu boju.

Nakon što je svježe srce ovce izvađeno iz osrčja, srčane šupljine isprane su mlazom hladne vode kroz otvor napravljen poprečnim rezom kroz prsnu aortu (*aorta thoracica*) približno 5 cm kaudalno od luka aorte (*arcus aortae*). Skinuto je masno tkivo dorzalno na srcu i izrađene su velike krvne žile baze srca. Rezom uzduž dorzalne stijenke aorte otvoren je lumen aorte do aortnog zatona (*sinus aortae*) gdje su utvrđena polazišta lijeve i desne koronarne arterije, te su u njihove otvore uvedene plastične cjevčice podrijetlom iz sustava za infuziju (slika 1B). Kroz cjevčice je pomoću šprice s iglom, u malim vremenskim razmacima, injektirano oko 6 mL smjese (slika 1C). Poslije injektiranja plastične cjevčice izvađene su iz arterije, a otvor je zatvoren vatom. Srce je zatim u okomitom položaju stavljeno u 2 %-tnu vodenu otopinu formaldehida radi konzerviranja. Tri dana nakon injektiranja poliuretanska smjesa u koronarnim arterijama potpuno se stvrdnula. U svrhu izrade koronarnih arterija i njihovih ogranaka uklonjen je dio epikarda, masnoga tkiva i srčanog mišića. Svakom izraženom ogranaku koronarnih arterija opisan je položaj, dodijeljen naziv i predviđeno područje vaskularizacije. Latinski anatomske nazivi dijelova srca i ogranaka koronarnih arterija preuzeti su iz *Nomina Anatomica Veterinaria* (*International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature* 2012.), Nickel i sur. (1981.), Evans i de Lahunta (2012.), a hrvatske istoznačnice od Padovana i suradnika (2006.) te Königa i Liebicha (2009.).

Slika 1. Srce ovce prije aplikacije poliuretanske smjese. A. Plastične cjevčice uvedene u otvore koronarnih arterija. B. Ubrizgavanje poliuretanske smjese s crvenim pigmentom (^) u plastičnu cjevčicu postavljenu u lijevu koronarnu arteriju. C. Legenda: TB –truncus brachiocephalicus, AA –arcus aortae, TP –truncus pulmonalis, AS – auricula sinistra, VD – ventriculus dexter, VS – ventriculus sinister, SA – sinus aortae, * – plastična kanila u otvoru lijeve koronarne arterije, # – plastična kanila u otvoru desne koronarne arterije.



REZULTATI I RASPRAVA

Lijeva i desna koronarna arterija (*a. coronaria sinistra* i *a. coronaria dextra*) ovce, kao i u drugih domaćih životinja i ljudi, prvi su ogranci uzlazne aorte (*aorta ascendens*). Izlaze iz početnog proširenja uzlazne aorte, tzv. aortne lukovice (*bulbus aortae*), čija je unutrašnjost podijeljena u tri proširenja između aortne stijenke i po jednog polumjesečastog zalistka. Ta se proširenja nazivaju aortni zatoni (*sinus aortae*), a iz dva zatona polaze koronarne arterije. Lijeva koronarna arterija polazi iz aortnog zatona iznad lijevog polumjesečastog zalistka (*valvula semilunaris sinistra*), a desna koronarna arterija iznad desnog polumjesečastog zalistka (*valvula semilunaris dextra*). U istražene ovce lijeva koronarna arterija bila je duža od desne, što je opisano i u drugih vrsta domaćih životinja (König i Liebich, 2009.).

Glavno deblo lijeve koronarne arterije (slika 2A, B/1) istražene ovce bilo je dužine 0,5 cm i smješteno između kaudalne stijenke plućnog debela (*truncus pulmonalis*) i lijeve uške (*auricula sinistra*). Chirlean i suradnici (2010.) opisuju slučaj svinje u koje nije uočena lijeva koronarna arterija, već su neposredno iz aorte, iz jedinog otvora, polazila njezina dva ogranka, silazni i optočni. Iz kaudodorzalnog dijela glavnoga debela lijeve koronarne arterije istražene ovce uočen je mali ogranak usmjeren u stijenk u lijeve uške. Ovaj ogranak odgovara ogranku koji Nickel i suradnici (1981.) nazivaju *ramus proximalis atrii sinistri* (slika 2A/2), no prema njihovom opisu on izlazi iz optočnog ogranka (*ramus circumflexus*), a ne iz glavnoga debela kao što je slučaj u istražene ovce. Na ulazu u koronarnu brazdu lijeva koronarna arterija podijelila se na dva veća ogranka, silazni (*ramus interventricularis paraconalis*) (slika 2A, B/3) i optočni ogranak (*ramus circumflexus*) (slika 2A, B, C/8). Ovakvo je grananje uobičajeno za lijevu koronarnu arteriju te je opisano u domaćih životinja. Silazni ogranak (*ramus interventricularis paraconalis*) leži u parakonalnoj međuklijetnoj brazdi (*sulcus interventricularis paraconalis*), a optočni ogranak (*ramus circumflexus*) u koronarnoj brazdi (*sulcus coronarius*). U istražene ovce silazni ogranak (*ramus interventricularis paraconalis*) protezao se duž parakonalne međuklijetne brazde i dao je dva kranijalna ogran-

ka za desnu klijetku te dva kaudalna ogranka za lijevu klijetku te je nastavio tok na desnu stranu srca. Kranijalni dorzalni ogranak usmjeren je prema arterijskom čunju (*conus arteriosus*) desne klijetke i naziva se *ramus coni arteriosus* (Nickel i sur., 1981.) (slika 2A, B/4). Kranijalni ventralni ogranak – *ramus ventricularis* (Evans i de Lahunta, 2012.) (slika 2 A/5), ulazi u ventralnu polovicu desne klijetke. Kaudalni ogranci usmjereni su prema lijevoj klijetki. Kaudalni dorzalni ogranak, *ramus collateralis proximalis* (Nickel i sur., 1981.) (slika 2A, B/6), odvaja se od silaznog ogranka na polovici dužine parakonalne međuklijetne brazde, usmjeren je prema vrhu srca i grana se u dva veća ogranka za lijevu klijetku, uključujući i vrh srca. Kaudalni ventralni ogranak, *ramus collateralis distalis* (Nickel i sur., 1981.) (slika 2 A/7), odvaja se od silazne grane u ventralnoj trećini parakonalne međuklijetne brazde i također je usmjeren prema vrhu srca. U istražene ovce silazni ogranak lijeve koronarne arterije kranijalno od vrha srca, a ležeći u usijeku vrha (*incisura apicis cordis*), prelazi s lijeve na desnu stranu. Nickel i suradnici (1981.) navode da u preživača silazni ogranak lijeve koronarne arterije seže samo do usjeka vrha i da ovdje anastomozira s *ramus interventricularis subsinuosus* optočnog ogranka. U istražene ovce u području usjeka srca iz *ramus interventricularis paraconalis* polaze *rami septales* (Nickel i sur., 1981.; König i Liebich, 2009.), tanki ogranci za ventralni dio lijeve i desne klijetke srca i za međuklijetnu srčanu pregradu (slika 2C, D/20). Nadalje, silazni ogranak lijeve koronarne arterije nastavlja tok na desnoj strani srca u subsinoznoj međuklijetnoj brazdi. S obzirom na položaj, taj dio silaznog ogranka lijeve koronarne arterije odgovara *ramus interventricularis subsinuosus* (slika 2 C/21), koji je inače u preživača ogranak optočnog ogranka lijeve koronarne arterije. U istražene ovce *ramus interventricularis subsinuosus* silaznog ogranka leži duž ventralnog dijela subsinozne međuklijetne brazde i doseže otprilike njegovu polovicu. Nismo mogli utvrditi anastomozira li s *ramus interventricularis subsinuosus* optočnog ogranka lijeve koronarne arterije koja se u istu tu brazdu spušta do polovice, ali s dorzalne strane. Silazni ogranak lijeve koronarne arterije opskrbljuje kaudalni dio desne klijetke, lijevu stranu lijeve klijetke i veći dio međuklijetne srčane pregrade (*septum*

interventriculare). U istražene ovce nismo utvrdili veliki ogranak za međuklijetnu srčanu pregradu koji izlazi iz debla lijeve koronarne arterije na mjestu ulaska u koronarnu brazdu, kao što su za srce preživača opisali Nickel i suradnici (1981.). Uočili smo samo manje ogranke za srčanu pregradu koje su podrijetlom od ventralnog dijela silaznog ogranka.

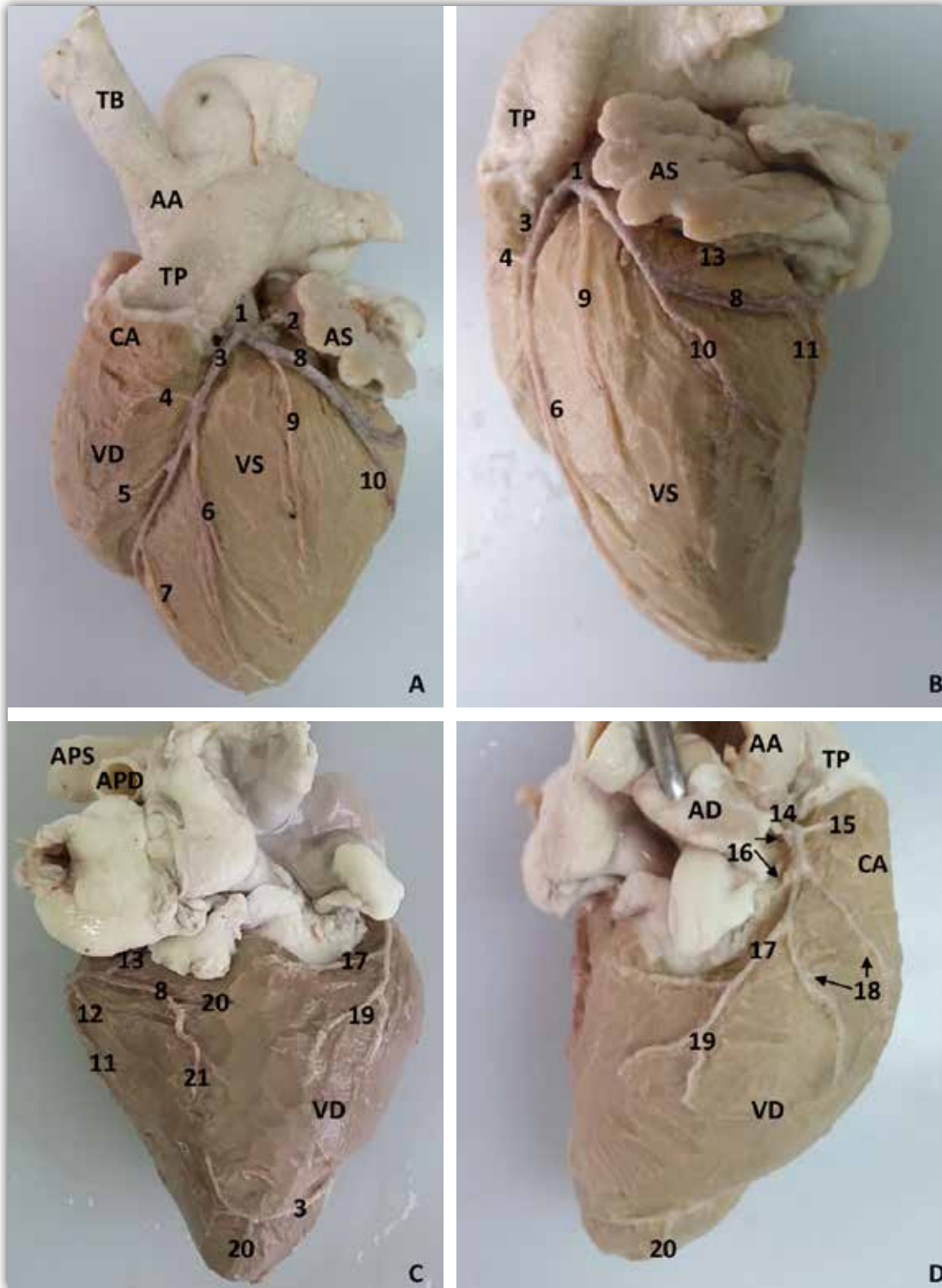
Drugi veliki ogranak lijeve koronarne arterija jest optočni ogranak (*ramus circumflexus*) (slika 2A, B, C/8) koji se smatra direktnim nastavkom lijeve koronarne arterije, a leži u lijevom kaudalnom dijelu koronarne brazde i dopire do njezina kaudalnog desnog dijela (Schaller, 2007.). Ovaj ogranak daje arterije usmjerene prema bazi srca i prema klijetkama. U istražene ovce uočeno je da iz optočnog ogranka izlaze četiri arterije u dorzalnom smjeru, odnosno u smjeru arterije u dorzalnom smjeru, odnosno u smjeru pretklijetku i lijevu ušku, *rami atriales* (Evans i de Lahunta, 2012.) (slika 2B, C/13). Ventralni ogranci optočne arterije u istražene ovce usmjereni su u lijevu klijetku. Prvi ogranak *ramus proximalis ventriculi sinistrii* (*ramus ventricularis*) (slika 2A, B/9) izlazi iz optočnog ogranka 1 cm kaudalno od njezina ulaska u koronarnu brazdu. Ovaj se ogranak usmjerava kaudoventralno u lijevi i kaudalni dio lijeve klijetke. Drugi veliki ogranak, *ramus intermedius* (slika 2A, B/10), koji Nickel i suradnici (1981.) nazivaju *ramus marginis ventriculi sinistrii*, odvaja se u ravnini kaudalnog ruba srca (*margo ventricularis sinister*) i leži uzduž navedenog ruba do njegove polovice te se nastavlja u dubinu srčanog mišića, moguće do vrha srca. Ovaj ogranak, osim u preživača, dolazi i u mesojeda i svinje (Schaller, 2007.). Nakon što je zavinuo oko kaudalnog ruba srca, optočni ogranak lijeve koronarne arterije daje jedan veći, *ramus distalis ventriculi sinistrii* (slika 2B, C/11) i jedan manji ogranak, *ramus ventricularis* (slika 2 C/12) za desnu stranu lijeve klijetke te se nastavlja ventralno u subsinoznu međuklijetnu brazdu. Ovdje u istražene ovce završava kao *ramus interventricularis subsinuosus* (slika 2 C/21) i daje tanke ogranke, *rami septales* (slika 2C, D/20), za desnu stranu međuklijetne srčane pregrade. Ove ogranke opisuje i Schaller (2007.) i navodi da opskrbljuju desnu stranu međuklijetne srčane pregrade. *Ramus interventricularis subsinuosus* je ogranak optočnog ogranka lijeve koronarne arterije u mesojeda, preživača i izni-

mno konja (Schaller, 2007.), dok ga u svinje i u većine konja daje desna koronarna arterija (Salomon i sur., 2008.). U istražene ovce *ramus interventricularis subsinosis* optočnog ogranka lijeve koronarne arterije nalazi se uzduž dorzalne polovice subsinozne međuklijetne brazde. Suprotno tome, König i Liebich (2009.) navode da u preživača i mesojeda *ramus interventricularis subsinosis* leži u subsinoznoj međuklijetnoj brazdi sve do vrha srca, što nismo uočili u istražene ovce. Kao što je navedeno, uočili smo da u ventralnom dijelu subsinozne međuklijetne brazde leži *ramus interventricularis subsinosis* podrijetlom od silaznog ogranka lijeve koronarne arterije.

Desna koronarna arterija (slika 2 D/14) polazi iz proširenja aortne lukovice iznad desnog polumjesečastog zalistka i usmjerena je između desne uške (*auricula dextra*) i plućnog debla (*truncus pulmonalis*) subepikardijalno prema desnoj strani koronarne brazde (Schaller, 2007., König i Liebich, 2009.). Evans i de Lahunta (2012.) spominju i dodatnu desnu koronarnu arteriju (*a. coronaria dextra accessoria*) u psa. U istražene je ovce desna koronarna arterija odmah nakon polazišta dala tanki ogranak za desnu stranu arterijskog čunja, *ramus coni arteriosi* (Nickel i sur., 1981) (slika 2 D/15). U ravnini grananja za arterijski čunj, desna koronarna arterija dala je jedan ogranak za desnu ušku i malo ventralnije još jedan koji također ulazi u stijenku desne uške. Obje ove arterije odgovaraju *rami atriales* (Evans i de Lahunta, 2012.) (slika 2 D/16) za opskrbu desne pretklijetke. Nakon ovih ogranaka za arterijski čunj i desnu pretklijetku, desna koronarna arterija ulazi u koronarnu brazdu. Taj je dio optočni ogranak desne koronarne arterije, *ramus coronarius* (König i Liebich, 2009.) (slika 2C, D/17), leži u koronarnoj brazdi i često anastomozira s optočnim ogrankom lijeve koronarne arterije, što u istražene ovce nije bio slučaj. Iz optočnog ogranka desne koronarne arterije u istražene ovce polazila su dva ogranka, *rami ventriculares* (Evans i de Lahunta, 2012.) (slika 2 D/18), za stijenku desne klijetke ventralno od arterijskog čunja. Treći ogranak bio je usmjeren prema kranijalnoj stijenci desne klijetke koja gradi kranijalni rub srca (*margo ventricularis dexter*) i odgovara ogranku kojeg opisuju Evans i de Lahunta (2012.) i nazivaju ga *ramus marginalis dexter* (slika 2C, D/19). Nakon ovog gra-

nanja optočni ogranak desne koronarne arterije nastavio je tok u kranijalnoj polovici desne strane koronarne brazde. U istražene ovce optočni ogranak desne koronarne arterije nije anastomozirao s optočnim ogrankom lijeve koronarne arterije, već je završio u srčanom mišiću desne strane desne klijetke u ravnini međuklijetne srčane pregrade. Ujedno, u istražene ovce desna koronarna arterija nije dala silazni ogranak (*ramus interventricularis subsinosis*) za subsinuožnu međuklijetnu brazdu (*sulcus interventricularis subsinosis*). Ovaj je ogranak u istražene ovce bio podrijetlom od optočnog ogranka lijeve koronarne arterije, što je slučaj i u 45 % ljudi (Fanghänel i sur., 2009.), i od silaznog ogranka lijeve koronarne arterije. U istražene ovce u subsinoznoj međuklijetnoj brazdi ležale su *ramus interventricularis subsinosis dorsalis* podrijetlom od optočnog ogranka i *ramus interventricularis subsinosis ventralis* podrijetlom od silaznog ogranka lijeve koronarne arterije. Schaller (2007.) navodi da je *ramus interventricularis subsinosis* u svinja, konja te katkad kod mačke ogranak desne koronarne arterije. Desna koronarna arterija i njezini ogranci opskrbljuju stijenku desne klijetke, dio međuklijetne srčane pregrade te dio lijeve klijetke (König i Liebich, 2009.). Budući da u istražene ovce ogranci desne koronarne arterije ne dosežu ventralni dio međuklijetne srčane pregrade, nju i s desne strane vaskulariziraju ogranci lijeve koronarne arterije.

Naš nalaz da optočni ogranci lijeve i desne koronarne arterije u ovce ne anastomoziraju u skladu je s tvrdnjom Königa i Liebicha (2009.) da su srčane arterije završne i njihovi ogranci ne oblikuju na svojim krajevima anastomoze. Isto navode Salomon i suradnici (2008.) iako tvrde da veći ogranci koronarnih arterija mogu tvoriti anastomoze, dok mali ogranci ne mogu. Suprotno tome, Dyce i suradnici (2010.) tvrde da nema anastomoza između većih ogranaka koronarnih arterija, a da su brojne između manjih ogranaka. Unatoč tome napominju da se iznenadno začepljenje jednog od tih manjih ogranaka ne može kompenzirati opskrbom iz drugoga malog ogranka, već dolazi do srčanog infarkta. Jedino su u psa utvrđene anastomoze između ogranaka srčanih arterija koje mogu tijekom postupnog začepljenja spriječiti srčani infarkt (König i Liebich, 2009.).



Slika 2. Srce ovce s apli-ciranom poliuretanskom smjesom

A) Facies auricularis, B) Norma caudalis, C) Facies atrialis, D) Norma cranialis

AA – arcus aortae; AD – auricula dextra; AS – auricula sinistra; APD – arteria pulmonalis dextra; APS – arteria pulmonalis sinistra; CA – conus arteriosus; TB – truncus brachiocephalicus; TP – truncus pulmonalis; VD – ventriculus dexter; VS – ventriculus sinister

1 – arteria coronaria sinistra, 2 – ramus proximalis atrii sinistri, 3 – ramus interventricularis paracoronalis, 4 – ramus coni arteriosi (a. coronaria sinistra), 5 – ramus ventricularis (r. interventricularis paracoronalis), 6 – ramus collateralis proximalis, 7 – ramus collateralis distalis, 8 – ramus circumflexus, 9 – ramus proximalis ventriculi sinistri (ramus ventricularis), 10 – ramus intermedius (ramus marginis ventriculi sinistri), 11 – ramus distalis ventriculi sinistri (ramus ventricularis), 12 – ramus ventricularis (r. circumflexi), 13 – rami atriales, 14 – arteria coronaria dextra, 15 – ramus coni arteriosi (a. coronaria dextra), 16 – rami atriales, 17 – ramus coronarius, 18 – rami ventriculares (a. coronaria dextra), 19 – ramus marginalis dexter, 20 – ramus septalis, 21 – ramus interventricularis subsinuosus

ZAKLJUČAK

Uobičajeni anatomske preparati srca dobiveni isključivo konzerviranjem pomoću formalina omogućuju ograničeni uvid u koronarne arterije i njihove ogranke. Ovako konzervirano srce sadržava prazne koronarne arterije i prilikom seciranja moguće je izraditi samo njihove velike ogranke čiji se opis može naći u uobičajenim udžbenicima iz područja veterinarske anatomije. Sitnije grane, koje ne spominje ni *Nomina Anatomica Veterinaria (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2012.)*, teško se izdvajaju iz masnoga tkiva i srčanog mišića koje ih okružuju, a upravo one imaju veliku važnost u dijagnostici i liječenju bolesti koronarnih arterija. Srce istražene ovce prije konzerviranja formalinom dodatno je obrađeno poliuretanskom smjesom s crvenim pigmentom. Ova je smjesa injektirana u otvore koronarnih arterija na njihovu polazištu unutar aortne lukovice. Koronarne arterije, čiji je lumen ispunila stvrdnuta poliuretanska smjesa, bile su manje podložne oštećenju pri sekciji pa su se ogranci koronarnih arterija mogli pratiti duboko u srčani mišić. Dobru vidljivost tijekom sekcije omogućio je crveni pigment dodan u poliuretansku smjesu. Ova pristupačna metoda prikaza koronarnih arterija olakšava izučavanje položaja krvnih žila srca u različitim životinjskih vrsta i omogućuje utvrđivanje anatomske varijacije.

Naše je istraživanje potvrdilo da u ovce lijeva koronarna arterija opskrbljuje mnogo veći dio srca nego desna koronarna arterija. Ovakva se opskrba naziva lijeva koronarna opskrba i prisutna je u preživača i psa, dok je u svinje i konja prisutna obostrana koronarna opskrba, tj. proporcionalno jednake dijelove srca opskrbljuju lijeva i desna koronarna arterija (Nickel i sur., 1981.; König i Liebich, 2009.). U istražene ovce uočili smo niz odstupanja od opisa u anatomske udžbenicima i time potvrdili svoju pretpostavku o velikoj anatomske raznolikosti ograna koronarnih arterija u domaćih životinja.

LITERATURA

- CHIRILEAN, I., A. DAMIAN, N. C. POPOVICI, F. STAN, C. DEZDROBITU (2010): Specific anatomical aspects of the aortic opening (*ostium aortae*) and of the left cardiac artery (*a. coronaria*

sinistra) in swine. Bulletin UASVM; Veterinary Medicine 67, 28-33.

- DYCE, K. M., W. O. SACK, C. J. G. WENSING (2010): Textbook of veterinary anatomy. 4thed., Saunders, Elsevier. Missouri.
- EVANS, H. E., DE LAHUNTA, A. (2012): Miller's anatomy of the dog, 4thed., Saunders, Elsevier. Missouri. str. 438-440.
- FANGHÄNEL, J., F. PERA, F. ANDERHUBER, R. NITSCH (2009): Waldeyerova anatomija čovjeka, Golden marketing – Tehnička knjiga. Zagreb, str. 863-865.
- International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2012): Nomina Anatomica Veterinaria. 5th ed. Editorial Committee of the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Hannover, Germany. Retrieved from http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2012.pdf
- KÖNIG, H. E., H.-G. LIEBICH (2009): Anatomija domaćih sisavaca, Naklada Slap. Jastrebarsko.
- NICKEL, R., A. SCHUMMER, E. SEIFERLE (1981): The anatomy of the domestic animals. Volume 3: The circulatory system, the skin, and the cutaneous organs of the domestic animals, Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg.
- NOESTELTHALLER, A., A. PROBST, H. E. KÖNIG (2007): Branching patterns of the left main coronary artery in the dog demonstrated by the use of corrosion casting technique. Anatomia Histologia Embryologia 36, 33-37.
- PADOVAN, I., N. ČIKEŠ, H. GOMERČIĆ (2006): Enciklopedijski rječnik humanog i veterinarskog medicinskog nazivlja. HAZU, Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Zagreb.
- SALOMON, F.-V., H. GEYER, U. GILLE (2008): Anatomie für die Tiermedizin. 2. Auflage, Enke Verlag. Stuttgart.
- SCHALLER, O. (2007): Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature, 2nded., Enke Verlag. Stuttgart.
- SHOFTI, R., A. ZARETZKI, E. COHEN, A. ENGEL, Y. BAR-EL (2004). The sheep as a model for coronary artery bypass surgery. Laboratory Animals 38, 149-157.

Dijagnostika gravidnosti koza

Pregnancy diagnosis in goats

Josipović, T. ^{1*}, I. Butković², J. Grizelj², S. Vince², B. Špoljarić²



Sažetak

Dijagnostika gravidnosti bitan je segment veterinarske djelatnosti u upravljanju i kontroli rasplodivanja koza, posebice prilikom držanja u intenzivnom uzgoju. Premda vlasnik životinje može posumnjati na gravidnost, neizbježna je uloga veterinara da kliničkom pretragom i metoda- ma poput ultrazvuka ili laboratorijskih testova utvrdi je li životinja gravidna ili nije i shodno tomu poduzme sve potrebne mjere oko reproduktivnog statusa životinje. Specifičnost spolnog ciklusa koza i sezonska poliestričnost dodatne su okolnosti i stvaraju potrebu za što ranijom dijagnosti- kom gravidnosti. Zadnjih četrdesetak godina dijagnostičke metode su usavršene tako da je moguće relativno brzo i lako dobiti nalaze dijagnostike, i to ne samo gravidnosti nego i podatke o starosti plodova, njihovoj brojnosti i vitalnosti.

Abstract

Pregnancy diagnosis is an important segment of veterinary medicine in managing the breeding control of goats, especially in intensive farming systems. Although the owner of an animal may suspect pregnancy, the veterinarian has a vital role in detecting whether an animal is pregnant or not, by clinical examination and methods such as ultrasound or laboratory testing. Accordingly, the veterinarian needs to take all measures to ensure the goats' health and ability to breed, or to exclude them in good time from the system. The specificity of their cycle, as seasonal breeders, is an additional burden, and gives rise to the need for early diagnosis of pregnancy. In the last 40 years diagnostic methods have improved to the point that diagnosis is relatively quick and easy, not only of pregnancy itself, but also of the fetus's age, the number of fetuses and their vitality.

UVOD

U današnje vrijeme kozarstvo ima veliko ekonomsko značenje s obzirom na to da ponu- da i potražnja za mesom te kozjim proizvodima uvelike utječu na upravljanje rasplodivanjem koza. Koze u intenzivnoj proizvodnji proma- tramo na razini stada, a ne jedinke, stoga je dužnost veterinara što ranije dijagnosticirati gravidnost kako bi se maksimalno smanjili eko- nomski gubici i kako bi se moglo pravodobno pristupiti rješavanju potencijalnih problema u plodnosti te liječenju bolesti vezanih uz repro- dukciju, kao i pratiti fiziološki razvoj zametaka

uz pripremu plotkinje za porođaj i laktacijsko razdoblje.

SPOLNI CIKLUS

Koza je najrasprostranjenija od svih vr- sta domaćih životinja te je prilagodila trajanje spolnog ciklusa ovisno o klimatskom području u kojemu se nalazi. U području umjereno-kon- tinentalne klime one su sezonski poliestrične životinje, što znači da im se spolni ciklus odvi- ja samo u određenoj sezoni godine u kojoj se gone u redovitim ciklusima, sve dok ne kon- cipiraju ili ne prođe sezona. Ciklička aktivnost

¹Tihana Josipović, studentica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
²asist. Ivan Butković, dr. med. vet.; izv. prof. dr. sc. Juraj Grizelj; doc. dr. sc. Silvijo Vince; viša asist. Branimira Špoljarić, dr. med. vet., Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
tihana.josipovic@gmail.com

Cljučne riječi: dijagnostičke metode, gravidnost, koza

Key words: diagnostic techniques, pregnancy, goat

jajnika pod kontrolom je hormonske osovine hipotalamus – hipofiza – jajnici, koja se aktivira pod utjecajem podražaja iz okoliša putem osjetila. Tako u koza svjetlost ima ključnu ulogu pri pojavi estrusa. S obzirom na duljinu dana koje se u vrijeme kratkog dana, a jare u proljeće. U nedostatku svjetlosnog podražaja, tj. tijekom noći (mraka) epifiza sintetizira i izlučuje hormon melatonin. Skraćivanjem dnevne svjetlosti produljuje se izlučivanje melatonina koje aktivira kaskadu hormona koji u konačnici dovode do spolne aktivnosti. Folikulostimulirajući (FSH) te luteinizirajući hormon (LH) odgovorni su za poticanje rasta i razvoja folikula u jajnicima te za ovulaciju. Uz njih još postoji niz drugih hormona i kemijskih tvari koje međusobnim spregama utječu na spolni ciklus i njegovu cikličnost. Osim svjetlosti (fotoperioda), bitnu ulogu u pojavi sezone estrusa, kao i ulaska u pubertet, imaju i drugi čimbenici, poput prisutnosti jarca, hranidbe, tjelesne razvijenosti, genotipa, bolesti i dr.

Do spolne zrelosti dolazi kada započnu redoviti i uredni spolni ciklusi koji omogućuju da se plotkinja rasploduje. Za koze to je u dobi od 5 do 10 mjeseci, tj. kada dosegnu 60 – 75% tjelesne mase roditelja (Samardžija i sur., 2010.). Ciklus u koza uobičajeno traje 21 dan (19 – 22 dana), ali fiziološki može varirati (12 dana ili dulje, do 26 dana) što je bitan podatak prilikom utvrđivanja gravidnosti, tj. izostanka estrusa kao jedne od metoda dijagnostike gravidnosti.

GRAVIDNOST

Gravidnost je razdoblje od trenutka oplodnje jajne stanice do porođaja. Prosječno trajanje gravidnosti u koza iznosi 150 dana, s odstupanjima do 140 ili 156 dana (Samardžija i sur., 2010.). Na trajanje gravidnosti utječu brojni čimbenici, poput nasljednih i pasminskih svojstava, hranidbe, dobi, klime, zdravstvenog stanja i kondicije, sezone u kojoj su koncipirale te broja plodova i dr. Svim procesima tijekom gravidnosti upravljaju endokrini i živčani sustav. Posteljica, kao poveznica između ploda i majke, također proizvodi cijeli niz hormona te se endokrini sustav mora s njom povezati u novi hormonski aktivni odnos. Sve je te promjene moguće detektirati u krvi i/ili ekskretima majke,

što u praksi služi za utvrđivanje gravidnosti, kao i određivanje njezina trajanja.

DIJAGNOSTIKA GRAVIDNOSTI

U posljednjih četrdesetak godina metode dijagnostike gravidnosti koza prilično su usavršene. Velik je broj metoda koje se mogu rabiti u detekciji gravidnosti od kojih su neke više, a neke manje zastupljene, uzevši u obzir njihovu točnost, dostupnost, lakoću korištenja, ali i ekonomsku isplativost. Prije provedbe metoda važno je ispravno uzeti iscrpnu anamnezu od vlasnika ili držatelja životinje, ali uvijek s dozom profesionalnog opreza. Najvažniji podatak jest datum pripusta ili umjetnog osjemenjivanja koze, zatim datum posljednjeg porođaja, laktacijsko razdoblje, tijek puerperija, pobačaji, vrijeme između estrusa, prisutnost jarca u istom boksu i dr. Kao prva metoda koju sam držatelj životinje najčešće primijeti jest znak izostanka estrusa. U koza je izostanak vanjskih znakova estrusa vidljiv 18. do 22. dan nakon koncepcije (Samardžija i sur., 2010.). Ovom je metodom moguće dobiti lažno pozitivne nalaze zbog ulaska u fiziološku anestriju (prestanak sezone tjeranja), pojave lažne gravidnosti ili pak zbog slabije izraženih znakova estrusa koje držatelj ne primjećuje ili zbog njegova neiskustva. Otkrivanje estrusa može se olakšati korištenjem mužjaka probača s kredom, koji zaskakivanjem s velikom sigurnošću otkriva i obilježi ženke u estrusu, ili pak puštanjem koza u hodnik da prođu pokraj boksa s jarcem. Ako je u estrusu, koza će zastati zbog olfaktornog podražaja. Unatoč svemu tome, nepouzdana je dijagnosticirati gravidnost isključivo praćenjem vanjskih znakova estrusa. Nakon dobivene anamneze veterinar pristupa kliničkim metodama kojima može dobiti pouzdan nalaz gravidnosti.

Kliničke metode

Osnovna klinička metoda temelji se na inspekciji i palpaciji. Među njih se ubraja vaginalna pretraga pomoću dilatatora ili spekuluma, kojom se promatra sluznica, maternični grljak i sadržaj (sluz), te vaginalna digitalna palpacija *a. uterinae caudalis* koja je primjenjiva od drugog mjeseca gravidnosti nadalje (Samardžija i sur., 2010.). Palpacijom abdomena moguće je osjetiti protuudar ploda (engl. *ballotement effect*)

preko stijenke trbuha od 80. dana gravidnosti (Samardžija i sur., 2010.). Metoda nije u potpunosti pouzdana jer neke jedinice imaju čvrstu muskulaturu abdomena, velike su ili pretile. Povećanje mliječne žlijezde, čak i u šilježica, ne bi se smjelo uzimati kao dokaz gravidnosti (Smith i Sherman, 2009.). Kao indikator poodmakle gravidnosti često se uzima povećana elastičnost kože oko stidnice te omekšanje zdjeličnih ligamenata (DeArmond, 1990.). Uz navedene, kliničkim metodama još pripadaju rendgenografija te ultrazvuk koji je najraširenija metoda dijagnostike gravidnosti.

Rendgen

Abdominalna rendgenografija rijetko se primjenjuje u dijagnostici gravidnosti, ali je korisna za precizno određivanje broja plodova. Plodovi su rendgenski najranije vidljivi 58. dan gravidnosti zbog osifikacije kostiju (Pugh, 2002.). Zbog potencijalno lažno negativnih rezultata najbolje je plotkinju pregledati nakon 90. dana gravidnosti.

Ultrazvuk

Ultrazvučna dijagnostika gravidnosti uključuje primjenu A-oblika, Doppler-ultrazvuka ili B-oblika skenera (Buckrell, 1999.). A-oblik prikaza eha može se primijeniti za dijagnostiku između 60. i 100. dana gravidnosti putem detekcije tekućine, što se interpretira kao gravidnost. Hidrometra ili povećan mokraćni mjehur mogu dati lažno pozitivne nalaze. S druge strane, lažno negativan nalaz dobije se ako ultrazvučni snop naiđe na fetus umjesto plodovu vodu (Smith i Sherman, 2009.).

Doppler-ultrazvukom veterinar može vidjeti otkucaje srca ploda i protok krvi u krvnim žilama majke i ploda. Rektalno je nakon 35. dana gravidnosti moguće vidjeti pulsaciju *a. iliaca externa* (Smith i Sherman, 2009.). Moguće je odrediti otkucaje srca ploda ili protok krvi u umbilikalnoj arteriji, čija bi frekvencija trebala biti dvostruko veća od majčine. Srčana frekvencija ploda obrnuto je proporcionalna sa starošću ploda (Fraser i sur., 1971.) te ju je transabdominalno moguće odrediti nakon 45. dana gravidnosti. Uređaj je jeftiniji, ali ne i toliko pouzdan kao B-oblik prikaza eha.

U današnje se vrijeme gotovo isključivo primjenjuje ultrazvučna dijagnostika pomoću re-



Slika 1. Plod starosti 45 dana.



Slika 2. Placentom u obliku slova C.

alnog vremena B-oblika skenera. Ono eliminira sve mogućnosti lažno pozitivnih nalaza jer se temelji na vizualizaciji fetusa, plodovih voda i/ili placentoma (Haibel, 1990.). Lažno negativni nalazi i dalje su mogući ako je došlo do kasnijih, neplaniranih koncepcija koje još nisu vidljive. Uređaj je lako prenosiv, stoga se može rabiti u terenskim uvjetima. Linearna transrektalna sonda frekvencije 5 MHz služi za rano utvrđivanje gravidnosti (20 – 30 dana od koncepcije), a transabdominalna kasnije u gravidnosti (nakon 35. dana) (Buckrell, 1988.). Uskraćivanje hrane i vode može pomoći boljoj vizualizaciji maternice, ali je nepotrebno jer može dovesti do komplikacija poput toksemije (Bretzlaff i sur, 1993.). Za transrektalnu ultrazvučnu pretragu potrebno je aplicirati manju količinu lubrikanta s analgetikom u rektum prije uvođenja lubricirane sonde. Najranije dijagnosticirana gravid-

Slika 3. Ultrazvučni pregled koze sektorskom sondom



nost pomoću transrektalne sonde utvrđena je s 18. dana gravidnosti.

Transabdominalnim mjerenjem zametnog mjehura ili dužine ploda od tjemena do trtice, zatim određenih mjera glave, promjera prsnoga koša, broja otkucaja srca i veličine placentoma moguće je procijeniti koliko je dugo životinja gravidna (Samarđžija i sur., 2010.).

Sondom je moguće vizualizirati i genitalni tuberkul, embrionalnu strukturu koja se nalazi između stražnjih nogu i pomiče se kranijalno prema pupku u muških te kaudalno prema repu u ženskih plodova. Najbolje vrijeme za otkrivanje spola jest između 55. i 75. dana gestacije, ali ga nije uvijek moguće vidjeti ako postoji više plodova (Santos i sur., 2007.). Transabdominalni ultrazvučni pregled sondom frekvencije 3,5 ili 5 MHz obavlja se na kozi koja stoji, s desne strane, na području baze mliječne žlijezde.

Da bi se omogućio što bolji kontakt između sonde i kože potrebno je to područje navlažiti alkoholom, uljem ili UZV gelom. Najranija transabdominalna dijagnostika moguća je od 30. dana gravidnosti pa sve do 120. dana, usmjerenjem ultrazvučnog snopa prema ulazu u zdjeličnu šupljinu. Mokraćni se mjehur smatra orijentacijskom točkom za daljnju pretragu. Maternica je većinom pozicionirana na desnoj strani abdominalne stijenke (Haibel, 1986.), tj. dorzalno i kranijalno od mokraćnog mjehura. Ako je plod jasno vidljiv, moguće je odrediti otkucaje srca ploda već od 25. do 30. dana (Smith i Sherman, 2009.). Placentomi se rutinski mogu naći od 30. dana (Buckrell i sur., 1986.), ali većinom se drži da je sigurnija njihova detekcija od 45. do 50. dana gravidnosti, kada su vidljivi u obliku slova C (Haibel, 1986.), primjerice na slici 2.

Postoji otprilike 120 – 125 placentoma u maternici koze, poredanih u četiri reda u svakom rogu (Lyngset, 1968.). Veličina placentoma varijabilna je i nije praktična za određivanje starosti, osim u ranoj gravidnosti. Za određivanje broja plodova prednost ima sektorska sonda. Najbolje uočavanje broja plodova postiže se pregledom između 40. i 70. dana gestacije (Lavoir i Taverne, 1989.).

Histološka metoda

Histološka metoda uključuje mikroskopski pregled broja slojeva stanica u površinskom vaginalnom epitelu. Za izvođenje ove metode potrebno je napraviti biopsiju vaginalne sluznice ispred orificijuma uretre (Samarđžija i sur., 2010.).

Tablica 1. Ultrazvučno vidljive strukture u gravidnosti

Trajanje gravidnosti	Vidljive strukture
17 – 25	Transrektalna pretraga: plod vidljiv nakon 24. dana
26 – 35	Transabdominalna pretraga: vidljiv hipoehogeni amnion i hiperehogeni fetus
30 - 75	Transabdominalna pretraga: placentomi C oblika, otkucaji srca
45 – 90	Doppler-ultrazvuk: otkucaji srca, dijagnosticiranje blizanaca
90 do porođaja	Sektorska sonda: dijagnosticiranje broja plodova, što je bliži termin porođaja, manja je točnost

Laboratorijski testovi

Laboratorijskim testovima dokazuje se prisutnost hormona i drugih kemijskih tvari (kvalitativna metoda) ili njihova koncentracija u uzorku (kvantitativna metoda) te je specifična za gravidnost, tj. određeni stadij gravidnosti. Hormoni koji se najčešće određuju jesu progesteron, estron-sulfat, placentalni laktogen i glikoproteini specifični za gravidnost.

Progesteron je hormon čijim se nalazom lakše utvrde negravidne negoli gravidne jedinke. Tijekom cijele gravidnosti izlučuje ga jajnik, stoga održavanje gravidnosti koza ovisi isključivo o progesteronu iz žutoga tijela. Koze se smatraju negravidnima ako imaju nisku razinu progesterona u serumu ili mlijeku tijekom pet ili više dana od pripusta ili umjetnog osjemenjivanja (Smith i Sherman, 2009.). Povišena razina progesterona može biti posljedica gravidnosti, ali može se pojaviti i kao lažno pozitivan nalaz u slučaju hidrometre, piometre, rane embrionalne smrtnosti, mumifikacije ploda ili nepravilna estrusnog ciklusa (Buckrell, 1999.).

Estrogen je hormon koji izlučuju jajnici i posteljica, a estron-sulfat smatra se produktom steroidne konjugacije koji nastaje isključivo u fetoplacentalnom tkivu (Refsal i sur., 1991.). Moguće ga je odrediti u mokraći, serumu ili mlijeku nakon 50. dana gravidnosti. Pozitivan nalaz siguran je znak da je plod vitalan (100% točnost iz krvi i mlijeka). Lažno pozitivni nalazi dobivaju se ako se koriste hemolizirani uzorci seruma. Lažno negativni nalazi mogu se dobiti ako je testiranje učinjeno prije 50. dana gravidnosti (Pugh, 2002.).

Placentalni laktogen je hormon kojeg izlučuje isključivo posteljica (Hayden i sur., 1980.). Za dijagnostiku gravidnosti može se uzeti plazma ili mlijeko i određivati njegova razina nakon 60. dana gravidnosti (Smith i Sherman, 2009.). Određivanjem razine ovog hormona moguće je utvrditi nosi li životinja jedan ili više plodova. Trenutačno nema dostupnog komercijalnog testa za kozji placentalni laktogen.

Glikoproteini specifični za gravidnost nastaju u korionskim binuklearnim stanicama posteljice te ih je moguće detektirati od 21. dana gravidnosti radioimunološkim testovima (Gonzalez i sur., 1999., 2000., 2004.). Ako se kod gravidnosti s više plodova uzastopnim te-

stovima utvrdi pad glikoproteina specifičnih za gravidnost, smatra se da je došlo do uginuća jednog od plodova (Zarrouki sur., 1999.).

PSPB (engl. *pregnancy specific protein B*) jest placentalni hormon koji služi kao indikator gravidnosti u koza (Humblot i sur., 1990.), krava i ovaca (Ruder i sur., 1988.). Fiziološka mu je uloga tijekom gravidnosti održavanje funkcije žutoga tijela te je znak razvoja posteljice i općenito gravidnosti. Dijagnostika gravidnosti u koza određivanjem PSPB-a moguća je nakon 26. dana (Smith i Sherman, 2009.). S pouzdanosti od 78% moguće je razlikovati nosi li životinja jedan ili više plodova (Samardžija i sur., 2010.). Nije sigurno koliko dugo nalaz ostaje lažno pozitivan ako dođe do uginuća nakon što se razvio endokrini sustav ploda i započeo s produkcijom hormona. Nedostatak ove metode jest što je uzorak potrebno slati u laboratorij.

ZAKLJUČAK

Svaki savjesni veterinar trebao bi prilikom dijagnostike gravidnosti u koza procijeniti situaciju na temelju anamneze te odrediti najprihvatljivije metode pretrage i dijagnostike s obzirom na zatečeno stanje i uvjete gospodarstva. Izbor metode ovisi o vrsti uzgoja (ekstenzivni, intenzivni) te broju koza koje je potrebno pregledati. Prednost se daje metodama koje mogu dati brz nalaz, primjerice ultrazvuk u kombinaciji s inspekcijom i palpacijom. Uz to, poželjno je uzeti i uzorke seruma, mlijeka ili urina za laboratorijske testove. Danas je na tržištu velika ponuda komercijalnih kitova za kvalitativnu detekciju hormona i drugih tvari specifičnih za gravidnost, koji su jeftini i praktični za uporabu pa time olakšavaju rad u terenskim uvjetima. Bitno je prilagoditi cijenu pregleda jer se koze promatra na razini stada, a ne jedinke, stoga se i metode tome moraju prilagođavati.

LITERATURA

- BRETZLAFF, K., J. EDWARDS, D. FORREST, L. NUTI (1993): Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. *Vet. Med.* 88, 12-24.
- BUCKRELL, B.C., B. N. BONNETT, W. H. JOHNSON (1986): The use of real-time ultrasound rectally for early pregnancy in sheep. *Theriogenology* 25, 665-673.

- BUCKRELL, B. C. (1988): Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology* 29, 71-84.
- BUCKRELL, B. C. (1999): Guelph system for transcervical AI (user manual). Small Ruminant Genetics, Georgetown, Ontario, Canada.
- DEARMOND, D. (1990): No-cost no-fault pregnancy test. *Dairy Goat J.* 68, 7, 62.
- FRASER, A. F., V. NAGARATNAM, R. B. CALLICOTT (1971): The comprehensive use of Doppler ultrasound in farm animal reproduction. *Vet. Rec.* 88, 202-205.
- GONZÁLEZ, F., F. CABRERA, M. BATISTA, N. RODRIGUEZ, J. SULON, J. S. BECKERS (2004): A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone and pregnancy associated-glycoprotein assays. *Theriogenology* 62, 1108-1115.
- GONZÁLEZ, F., P. CALERO, E. QUESADA, J. GARBAYO, J. BECKERS (2000): The pregnancy associated glycoproteins (Pags) in the caprine species: fundamental and clinical approach. Proceedings of the 7th International Conference on Goats, May, Tours, France. 1, 413-415.
- GONZÁLEZ, F., J. SULON, J. M. GARBAYO, M. BATISTA, F. CABRERA, P. O. CALERO, A. GRACIA, J. S. BECKERS (1999): Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology* 52, 717-725.
- HAIBEL, G. K. (1986): Real-time ultrasound assessment of the uterus and fetus in small ruminants. Proceedings of the Annual Meeting, Society for Theriogenology 17-19 September. Rochester, New York. str. 275-277.
- HAYDEN, T. J., C. R. THOMAS, S. V. SMITH, I. A. FORSYTH (1980): Placental lactogen in the goat in relation to stage of gestation, number of fetuses, metabolites, progesterone and time of day. *J. Endocrinol.* 86, 279-290.
- HUMBLLOT, P., G. DE MONTIGNY, N. JEANGUYOT, F. TETEDOIE, B. PAYEN, M. THIBIER, R. G. SASSER (1990): Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in French Alpine goats throughout gestation. *J. Reprod. Fert.* 89, 205-212.
- LAVOIR, M. C., M. A. M. TAVERNE (1989): The diagnosis of pregnancy and pseudopregnancy, and the determination of foetal numbers of goats, by means of real-time ultrasound scanning. In: *Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction*. M. A. M. Taverne and A. H. Willemse (eds.) Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- LYGSET, O. (1968): Studies on reproduction in the goat, II. The genital organs of the pregnant goat. *Acta Vet. Scand.* 9, 242-252.
- PUGH, D. G. (2002): *Sheep and goat medicine*, 1st ed., Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, United States of America. P. 160-163.
- REFSAL, K. R., J. V. MARTENIUK, C. S. F. WILLIAMS, R. F. NACHREINER (1991): Concentrations of estrone sulfate in peripheral serum of pregnant goats: relationships with gestation length, fetal number and the occurrence of fetal death *in utero*. *Theriogenology* 36, 449-461.
- ROWE, J. D., N. E. EAST (1998): Reproductive management - Part I: estrous cycles, synchronization, artificial insemination, pregnancy diagnosis. Small Ruminants for the Mixed Animal Practitioner Western Veterinary Conference, Las Vegas, NV. P. 137.
- RUDER, C. A., J. N. STELLFLUG, J. J. DAHMEN, R. G. SASSER (1988): Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 29, 905-912.
- SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. Veterinarski fakultet. Zagreb, Hrvatska. str. 45-120, 175-218, 342-344.
- SANTOS, M. H. B., É. P. B. X. MORAES, F. Q. G. BEZERRA, R. T. D. MOURA, F. P. LOPES, J. P. NEVES, P. F. LIMA, M. A. L. OLIVEIRA (2007): Early fetal sexing of Saanen goats by use of transrectal ultrasonography to identify the genital tubercle and external genitalia. *Am. J. Vet. Res.* 68, 561-563.
- SMITH, M. C., D. M. SHERMAN (2009): *Goat medicine*, 2nd ed., Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, United States of America. pp. 575-579.
- ZARROUK, A., I. ENGELAND, J. SULON, J. F. BECKERS (1999): Determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in goats (*Capra hircus*) with unsuccessful pregnancies: a retrospective study. *Theriogenology* 51, 1321-1331.



Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu



SEDMI MEĐUNARODNI KONGRES

„VETERINARSKA ZNANOST I STRUKA“

Zagreb, 5. – 7. listopada 2017. godine



Iznimno nam je zadovoljstvo pozvati Vas na međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“ koji će se održati 5., 6. i 7. listopada 2017. godine u prostorima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U okviru ovogodišnjeg kongresa po prvi će se put održati Dan doktorata na kojemu će doktorandi Veterinarskoga fakulteta predstaviti svoja istraživanja.

PRELIMINARNI PROGRAM

5. listopada 2017.
Svečano otvorenje kongresa
Usmena izlaganja
Poster
Domjenak dobrodošlice

6. listopada 2017.
Usmena izlaganja
Poster
Radionice
Dan doktorata

7. listopada 2017.
Usmena izlaganja
Radionice za javnost

IZLAGANJA

Teme znanstvenih i stručnih radova mogu obuhvaćati sva područja veterinarske medicine uključujući temeljne, prirodne i pretkliničke znanosti, animalnu proizvodnju i biotehnologiju, veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane te kliničke znanosti. Za Dan doktorata Znanstveni odbor će za predstavljanje odabrati teme iz doktorskih radova u postupku.

Svi prihvaćeni sažeci bit će objavljeni u Zborniku sažetaka. O ishodu recenzije autori će biti obaviješteni do 24. srpnja 2017. Službeni jezici kongresa su hrvatski i engleski.

Usmena izlaganja bit će raspodijeljena u odgovarajuće sekcije, o čemu će autori biti naknadno obaviješteni.

Poster bit će izloženi u prostorima Veterinarskoga fakulteta tijekom trajanja kongresa. Širina postera iznosi do 80 cm, a visina do 100 cm.

RADIONICE

Tijekom kongresa održat će se više radionica iz područja unutarnjih bolesti i kirurgije malih životinja, dijagnostike i liječenja bolesti konja i farmских životinja, dijagnostike u egzotičnih životinja te sigurnosti hrane.

Sve detaljne obavijesti bit će dostupne na web-stranici kongresa i u drugoj obavijesti.

Svi zainteresirani mogu se prijaviti putem obrasca za prijavu na web-stranici kongresa zaključno do **17. srpnja 2017.**

KOTIZACIJA I PRIJAVA

Rana kotizacija (uplaćena do 1. lipnja 2017.) iznosi 550,00 kn (PDV uključen).

Kotizacija uplaćena nakon 1. lipnja 2017. iznosi 750,00 kn (PDV uključen).

Kotizacija se uplaćuje na žiro-račun Veterinarskoga fakulteta HR1723600001101354554. U rubrikama Poziv na broj navesti: 305-_____ (OIB uplatitelja) i Svrha uplate navesti: kotizacija za VZS 2017 „ime i prezime“ i „OIB“.

Studenti integriranoga preddiplomskog i diplomskog studija ne plaćaju kotizaciju.

Sukladno Pravilniku o stručnom usavršavanju doktora veterinarske medicine, pasivno sudjelovanje na kongresu bodovat će se s 4 boda, a aktivno s 10 bodova. Sudjelovanje na radionici dodatno će se bodovati s 3 boda.

Krajnji datum za prijavu sažetaka je 12. lipnja 2017.

Prijava je moguća putem online obrasca na web adresi: <http://www.vef.unizg.hr/vzs2017>

VAŽNI DATUMI

Rana prijava sudionika	1. lipnja 2017. godine
Predaja sažetaka	12. lipnja 2017. godine
Obavijest o prihvaćanju sažetaka	24. srpnja 2017. godine
Prijava za radionice	17. srpnja 2017. godine

PREDSTAVLJANJE TVRTKI

Tvrtke koje žele predstaviti svoje proizvode i usluge na kongresu ili u Zborniku sažetaka mogu popuniti prijavu sudjelovanja i poslati je do 17. srpnja 2017. godine ili kontaktirati izravno organizatora na vzs2017@vef.hr.

Tajnica kongresa

Druga obavijest s detaljnim programom kongresa bit će objavljena početkom rujna 2017. godine. Sve dodatne informacije dostupne su na <http://www.vef.unizg.hr/vzs2017>

ORGANIZATOR

Sveučilišta u Zagrebu
Veterinarski fakultet

ORGANIZACIJSKI ODBOR

Predsjednik:
Zoran Vrbanc

Dopredsjednici:
Nika Brkljača Bottegara
Nevijo Zdolec

Članovi domaćeg

organizacijskog odbora:

Damir Agičić, Jasna Aladrović, Iva Benvin, Diana Brozić, Ivan Forgač, Anđelko Gašpar, Alen Hraštnik, Maja Lukač, Nino Mačević, Mario Ostović, Nikica Prvanović - Babić, Lada Radin, Nevenka Rudan, Krešimir Severin, Magda Sindičić, Zrinka Štrifot, Jelena Šuran, Ivana Tlak Gajger, Ivan Vlahek, Lana Vranković, Ivona Žura Žaja, Slavko Žužul

Članovi međunarodnog

organizacijskog odbora:

Sanja Aleksić-Kovačević, Tibor Bartha, Otto Doblhoff-Dier, Nihad Fejzić, Andrej Kirbiš, Danijela Kirovski, Vanja Krstić, Jana Mojžišova, Lazo Pendovski, Vladimir Petkov, Foteini Samartzi, Muhamed Smajlović, Breda Jakovac Strajn, Martin Tomko, Igor Ulčar, Gorazd Vengušt, Petra Winter, Petra Zrimšek

ZNANSTVENI ODBOR

Goran Bačić, Ljubo Barbić, Željko Cvetnić, Tomislav Dobranić, Petar Džaja, Martina Đuras, Anamaria Ekert Kabalin, Željko Grabarević, Juraj Grizelj, Andrea Gudan-Kurilj, Boris Habrun, Danijela Horvatek Tomić, Dean Konjević, Josip Kos, Josip Madić, Alemka Markotić, Dražen Maticić, Vesna Matijatko, Zoran Milas, Marko Samardžija, Alen Slavica, Nenad Turk, Romana Turk, Tatjana Vilibić-Čavlek, Ksenija Vlahović

TAJNICA KONGRESA

Martina Jović

Udruga studenata veterinarske medicine **USVM**

Udruga studenata veterinarske medicine novoosnovana je udruga kojoj je zadaća ujediniti sve studente Veterinarskoga fakulteta s ciljem promicanja Fakulteta i veterinarske medicine općenito. Udruga se sastoji od prijašnjih udruga koje su djelovale na Veterinarskom fakultetu (IVSA, Equus, SportVEF), ali i svi studenti koji nisu članovi udruge također se mogu učlaniti. Udrugu će voditi predsjedništvo koje se sastoji od sedam članova: predsjednik USVM-a,

potpredsjednik USVM-a, dva predstavnika Studentskog zbora te po jedan predstavnik IVSA-e, Equusa i SportVEF-a. Sve odluke koje se donesu trebaju biti izglasane na skupštini koju čine svi članovi udruge.

U srijedu 1. ožujka 2017. održana je izborna skupština Udruge studenata veterinarske medicine. Okupljene studente, članove udruge Equus, IVSA i SportVEF, uvodnim je govorom pozdravila uprava Fakulteta na čelu s dekanom prof. dr. sc. Nenadom Turkom i prodekanom izv. prof. dr. sc. Ljubom Barbićem. Nakon toga je kolega Tomislav Bosanac upoznao članove skupštine s ciljevima i zadacima novoosnovane udruge te su provedeni izbori za novoga predsjednika, zamjenika predsjednika, tajnika i zamjenika tajnika. Za predsjednika USVM izabran je Leon Kuna, a za njegovog zamjenika Andrej Kupres. Novoizabrana tajnica je Stella Lukman, sa svojom zamjenicom Sofijom Džakulom. Također velika hvala kolegi Mihajlu Jakoviću na izradi loga udruge! Novo vodstvo udruge sa zadovoljstvom je preuzelo uloge koje su im dodijelili ostali članovi skupštine i jedva čekaju početi s unapređivanjem udruge i aktivnim sudjelovanjem u svim projektima i zadaćama koje će se staviti pred njih!

Obavijesti o radu udruge i predstojećim skupštinama bit će objavljene na Facebook profilu udruge pa ovim putem pozivamo sve studente da podrže stranicu na Facebooku.

Slika 1. Logo USVM.



Slika 2. Pozdravni govor dekana na izbornoj skupštini USVM-a.



USVM EQUUS

Udruga studenata veterinarske medicine Equus neprofitabilna je udruga osnovana davne 1993. godine. Osnovani su je studenti Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom pok. izv. prof. dr. sc. Igora Štokovića i izv. prof. dr. sc. Ljube Barbića. Udruga se u početku sastojala od nekoliko sekcija: kinološke i felinološke sekcije, konjičke sekcije, sekcije za glodavce, fotografske i izdavačke te informatičke sekcije. Svaka je sekcija sama za sebe organizirala različite projekte – izložbe, kongrese, razmjene, putovanja itd. Sve su sekcije 2012. godine ukinute i udruga je pod vodstvom Zlatka Bježančevića započela novo razdoblje svojega djelovanja.

Novoj generaciji *equusovaca* cilj je bio organiziranje edukativne izložbe „Reptilomanija+“. Taj je cilj i ostvaren te je tako 7. svibnja 2013. svečano otvorena prva „Reptilomanija+“, skromna izložba sa svega petnaestak životinjskih vrsta, nekoliko popratnih predavanja i nekoliko stotina posjetitelja. Svake sljedeće godine izložba je rasla, širila se, povećavala broj izložbenih vrsta te tako došla na prošlogodišnju brojku od preko 40 izloženih životinjskih vrsta, 10 predavanja i više od 8000 posjetitelja. Ove godine krećemo i korak dalje. Na petoj, jubilarnoj „Reptilomaniji+“, koja će se održati od 10. do 14. svibnja 2017. godine., u suradnji s Hrvatskom veterinarskom komorom, besplatna predavanja u sklopu izložbe za sve prijavljene veterinare vrednovat će se s 4 boda za aktivno i 3 za pasivno sudjelovanje.

Dio *equusovaca* također brine o vođenju Nastambe za egzotične i laboratorijske životinje koja se nalazi na Veterinarskome fakultetu. Desetak vrsta egzotičnih glodavaca i dvojezubaca te pet vrsta gmazova svakodnevno od naših volontera do-

bivaju svu ljubav i pažnju koja im je potrebna. Također, brinu se da sve životinje budu u čistom te da svaki dan dobiju hranu i vodu. Životinje se u nastambi koriste isključivo u edukativne svrhe. U suradnji sa Zavodom za stočarstvo, Zavodom za anatomiju, histologiju i embriologiju i Klinikom za unutarnje bolesti organiziraju se vježbe u nastambi, gdje studenti uče kako pristupiti i pregledati te zanimljive životinjske vrste o kojima se na redovitoj nastavi na fakultetu ne uči dovoljno, a koji su svakodnevni pacijenti u veterinarskim ambulancama.

Katarina Marjanović



Slika 1. Anđela Šimić i Zlatko Bježančević s Priznanjem za organizaciju Reptilomanije+.



Slika 2. Rektorova nagrada.

REPTILOMANIJA+

EDUKATIVNA IZLOŽBA

10. - 14. svibnja 2017.
od 10 do 20 sati

ULAZ SLOBODAN

SVEČANO OTVORENJE
10. svibnja 2017. u 12:00 sati

IVSA HRVATSKA

European Veterinary Students Seminar

Prije nekoliko mjeseci studentska udruga IVSA prijavila se za domaćina 2. EVSS-a. Nakon nekoliko tjedana iščekivanja kolege iz Europe odabrali su upravo nas tako da sada s ponosom možemo reći da će se sljedeći seminar ili, kako ga već sada zovemo, Kongres studenata održati od 14. do 17. lipnja 2018. godine na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu! U tom ćemo razdoblju ugostiti 80 studenata (i stranih tako i naših) koji će prisustvovati brojnim radionicama i predavanjima, ali i zabavnim i društvenim događanjima.

Što je EVSS?

European Veterinary Students Seminar jest znanstveno-stručni seminar studenata veterinarske medicine kojemu je glavni cilj razvoj stručnih kompetencija. Seminar je koncipiran u obliku predavanja i radionica na kojima se obrađuju aktualne teme u svijetu veterine. Predavanja su tematski vezana uz *One Health* inicijativu kojoj je cilj povezati i ostvariti blisku suradnju između svih djelatnika u području zaštite zdravlja ljudi, životinja i okoliša. Opći je cilj seminara stvaranje mreže poznanstava i uspostavljanje znanstveno-istraživačke suradnje među sudionicima, te rasprava o problemima u obrazovnom sustavu i njegovo unapređenje. Predavanja posvećena inicijativi *One Health* upoznat će studente o važnosti suradnje između različitih struka sa zajedničkim ciljem očuvanja zdravlja ljudi, životinja i okoliša. Održavanjem radionica ostvarit ćemo brojne specifične ciljeve, od kojih posebno izdvajamo praktično

usvajanje suvremenih metoda u kliničkoj praksi, razvoj komunikacijskih vještina i mogućnosti unapređenja rada postojeće prakse kroz poslovni način razmišljanja.

Polako smo krenuli s organizacijom projekta – oformili smo organizacijski odbor, smislili plan i program, napisali projektni prijedlog koji šaljemo mogućim sponzorima. Zahvalni smo Uredu dekana i Upravi fakulteta koji su nam velika potpora i na koje uvijek možemo računati. Radujemo se upoznavanju kolega iz cijele Europe, razmjeni iskustava i učenju, stoga ćemo se potruditi i organizirati jedan kvalitetan seminar, kakav i priliči našem fakultetu i struci!

Nina Vukušić,
predsjednica IVSA-e Hrvatska i Organizacijskog odbora



Slika 1. Radna verzija loga.



Slika 2. Aktivni članovi IVSA-e.

European Veterinary Students Seminar Utrecht 2016.

European Veterinary Students Seminar (EVSS) osmislili su studenti iz Utrechta gdje je i održano prvo izdanje seminara. Iza ideje i organizacije stoji Međunarodno udruženje studenata veterine, IVSA. Seminar je namijenjen studentima veterinarske medicine svih europskih zemalja (ne samo članica EU) koji su članovi IVSA-e. Na seminaru je bilo 86 sudionika iz 23 europske zemlje, a Hrvatska je imala čak sedam predstavnika. To su kolege Hrvoje Bezmalinović, Mateja Buriša, Daria Damjanović, Ana Kajmić, Dina Jelenčić, Iva Benvin i ja.

Seminar je organiziran pod sloganom „*United by our challenges, strengthened by our solutions*“, a cilj je bio okupiti studente iz što većeg broja europskih zemalja kako bi se pro-

movirala razmjena znanja i iskustava, stvorila svijest o problemima koji se tiču svih zemalja i, naravno, sklopila prijateljstva za budućnost. U sklopu seminara održana su brojna predavanja i radionice koji su obrađivali zadanu tematiku. Obuhvaćeno je šest tema od kojih je prva „*Puppy mafia*“ u kojoj se govorilo o problemu nekontroliranog uzgoja pasa u zemljama nižega životnog standarda i njihovu uvozu u bogatije zemlje. Druga tema „*A year after the abolishment of the milk quota*“ prezentirala je učinke i posljedice kvota za proizvodnju mlijeka. Sljedeća tema „*Doping in equine sports*“ ukratko je objasnila problematiku dopinga u konjičkom sportu s osvrtom na Olimpijske igre i uputila na kompleksnost problema. Nadalje, tema „*Educating Europe's future vets*“ iznosi načine postizanja maksimalne kompetentnosti i potrebu specijalizacija u pojedinim područjima. Tema „*Let every zebra's stripes be unique: keeping EU zoos genetically diverse*“ pokazala je primjere održavanja genetičke raznolikosti u zooološkim vrtovima i akvarijima, kao i važnost rezervnih populacija životinja za koje se očekuje da će izumrijeti u divljini.

Posljednja tema, „*Leadership skills*“, obrađena je na radionicama na kojima su studenti unaprijedili vještine uzimanja anamnestičkih podataka te moderiranja razgovora s klijentima.

Slušali smo i predavanja o unapređivanju nastave iz anatomije izradom preparata fiksiranih silikonom, zaraznim bolestima koje su trenutačna prijetnja EU, te o ulozi veterinaru u skloništima za životinje s naglaskom na unapređenje održavanja i fizičkog i psihičkog zdravlja životinja. Osim nastavnog programa u seminar su bili uključeni obilazak fakulteta veterinarske medicine u Utrechtu, samoga grada te dva partyja.

Slika 1. Naši predstavnici na predavanju.



Slika 2. IVSA Croatia, IVSA Slovenia i IVSA Belgrade.



Ovaj će se seminar održavati svake dvije godine i trajat će četiri dana. Participacija za seminar iznosi 110€ po sudioniku, a uključuje smještaj, hranu i sve nastavne sadržaje.

Od zanimljivosti bih istaknuo da je Nizozemska zemlja s više bicikala nego stanovnika, pa smo se tako i mi ta četiri dana za prijevoz koristili biciklima. Od predavača bih istaknuo prof. Claudiu Wolschrijn koja je predsjednica EAVA-e (*European Association of Veterinary Anatomists*) i prof. Marianne Marijke Baronesse Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan koja je glavni veterinar FEI-a (*Federation Equestre Internationale*). Osim njih, svi su predavači bili istaknuti znanstvenici u svojim područjima i mogu reći da mi je bila čast imati priliku slušati njihova predavanja.

Svakome bih preporučio da barem jednom za vrijeme studija prisustvuje nekom od mnogobrojnih neformalnih obrazovnih programa i dobije barem mali uvid u bezbrojne mogućnosti koje nam se pružaju. Istaknuo bih i brojna nova poznanstva, kao i sate razgovora o stanju veterinarstva i obrazovanju u pojedinim zemljama, ali i manje formalnim temama. Isto tako, na seminaru smo upoznali novu kulturu, njihov način pristupa obrazovanju i uvidjeli koliko su zaista posvećeni svojoj struci. Osobna motivacija za prijavu na seminar bila je odlična prezentacija seminara i ponuđenih tema, ali i novo iskustvo s obzirom na to da je ovo bio prvi EVSS.

Ovim putem želim u ime svih sudionika zahvaliti dekanu prof. dr. sc. Nenadu Turku na osiguranju participacija te tvrtki Croatia Airlines na posebnoj ponudi za putovanje.

Luka Špelić,
student 3. godine



Slika 3. Party na brodu.



Slika 4. Obilazak Utrechta.



Slika 5. Sudionici EVSS-a.



IVSA Hrvatska

IVSA te poziva!

Učlani se i...

PUTUJI

- >Razmjena IVSA Wroclaw - IVSA Croatia (14. - 21. svibnja 2017.)
- >CRO-SLO-AUSTRO-CZECH weekend (28. - 30. svibnja 2017.)
- >IVSA Napoli Biodiversity in Campania Region (18. - 25. svibnja 2017.)
- >Veterinary English Seminar (2. - 4. i 16. - 18. lipnja 2017.)
- >IVSA Thailand Summer Event (10. -16. lipnja 2017.)
- >66th IVSA Congress in Malaysia (24. srpnja - 4. kolovoza 2017.)
- >Symposium JAR (Prosinac 2017.)
- >IVSA Croatia EVSS (14. - 17. lipnja 2018.)

VOLONTIRAJ I ZABAVI SE!

- Tombola!
- Slatki dan na VEF-u!
- Pancakes day!
- Humanitarne akcije!
- Kviz znanja!
- Tulum!
- Izleti!
- Druženja!

IVSA (*International Veterinary Student's Association*) jest globalna udruga studenata veterinarske medicine. Glavni je cilj udruge promicanje dobrobiti životinja i ljudi te potenciranje i planiranje međunarodnih projekata, sve u cilju promidžbe veterinarske struke. Svrha IVSA-e također je promicanje suradnje studenata veterinarske medicine u Hrvatskoj i u svijetu na području stručnog obrazovanja, veterinarske prakse, stručnog usavršavanja i znanstvenog rada.

IVSA organizira razmjene studenata. Time se omogućuje članovima da vide na koji način funkcioniraju drugi fakulteti veterinarske medicine i tako prošire svoje dosadašnje iskustvo te ostvare nova prijateljstva sa studentima veterine iz inozemstva. Svake godine individualno možete sudjelovati na kongresima, simpozijima i radionicama u inozemstvu čiji je organizator IVSA.

KAKO SE PRIDRUŽITI?

IVSA Hrvatska svaki mjesec ima sastanak na kojem se skupe članovi i dogovaraju razmjene te druge aktivnosti udruge. Ako imate dodatna pitanja ili želite doći na sljedeći sastanak, slobodno nam se javite!

Facebook stranica: <https://www.facebook.com/ivsa.cro/>
predsjednica: Nina Vukušić, nina.vukusic14@gmail.com
exchange officer: Iva Benvin, iva.benvin55@gmail.com



Humanijada

Humanijada je međunarodni sportsko-edukacijski susret biomedicinskih fakulteta koji se održava još od 1993. godine. Na Humanijadi sudjeluju svi fakulteti biomedicinskog područja iz Hrvatske i susjedne Bosne i Hercegovine. Svake godine čast organizacije dobiva pojedini fakultet te je tako protekle akademske godine tu čast imao Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji je organizirao 24. po redu Humanijadu u Makarskoj, od 4. do 8. svibnja 2016. Ovogodišnja, 25. po redu Humanijada dodijeljena je Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Ove godine, nakon niza humanijada provedenih na Jadranu, organizatori su odlučili događaj preseliti na kontinent. Tako će se 25. Humanijada održati u Termama Tuhelj u Tuheljskim toplicama, od 3. do 7. svibnja 2017. godine. Očekuje se velik broj natjecatelja, pa tako i sportska udruga Veterinarskoga fakulteta SportVEF šalje svoje članove. Natjecat ćemo se u futsalu (M i Ž), odbojci (M i Ž), košarci te pojedinačnim sportovima kao što su tenis i stolni tenis.



Slika 1. Humanijada 2014- muška košarkaška ekipa.



Slika 2. Humanijada 2015- ženska nogometna ekipa.



Slika 3. Humanijada 2016- ženska odbojkaška ekipa.



Hvala CEEPUS-u za divan rujan u Ljubljani

Konji su oduvijek moja velika ljubav. Otkad znam za sebe sanjala sam kako ću jednog dana postati veterinarica i liječiti konje. Na trećoj godini studija počela sam volontirati na Klinika-ma Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu, vezano uz konje. Kako je vrijeme prolazilo, marljivim radom sa svakim pacijentom, uz mentorstvo doc. dr. sc. Nike Brkljače Bottegaro i dr. sc. Jelene Gotić, skupljala sam znanje i iskustvo. Na petoj godini htjela sam vidjeti kako se radi u drugim zemljama, na drugim fakultetima. Prijavila sam se za CEEPUS razmjenu studenata te sam dobila priliku boraviti mjesec dana u Ljubljani, na Klinici za konje.

Moje putovanje počinje 1. rujna 2016. u ranim jutarnjim satima i traje do 30. rujna 2016. Krenula sam autobusom iz Zagreba te za dva sata stigla u Ljubljanu. Bila sam smještena u studentskom domu Rožna dolina, udaljenom petnaest minuta hoda od fakulteta na kojemu sam provodila mnogo vremena.

Dolaskom u Ljubljanu prijavila sam se u studentski dom, potom na fakultet i počela je moja mjesec dana duga praksa. Svaki sam dan odlazila na Kliniku za konje, sudjelovala u njihovom radu, naučila mnogo stvari, vidjela nove slučajeve.

Sretna sam što su se dr. Petra Kramarič i dr. Vesna Kadunc Kos angažirale i potrudile da vidim svakog pacijenta, što su me naučile mnogim stvarima koje do sada nisam vidjela i što su mi dopustile aktivno sudjelovanje u svakodnevnoj praksi. Posebno su mi u sjećanju ostali pa-

cijenti kojima je bila potrebna intenzivna skrb, gdje sam imala priliku dežurati uz njih 24 sata. Isto tako, ostalo osoblje Klinike i studenti bili su susretljivi, spremni na suradnju i ugodni, te smo si svi zajedno pomagali, učili i radili.

Osim kvalitetne prakse, imala sam vremena za upoznavanje Ljubljane i okolnih mjesta. Tako sam jednu subotu provela u Lipici na konjičkom natjecanju s prijateljicom koja je nekoliko mjeseci prije, isto u okviru CEEPUS-a, boravila na fakultetu u Zagrebu.

Izrazito sam zahvalna na pruženoj prilici i novostečenom iskustvu koje će mi zauvijek ostati u lijepom sjećanju. Sama je organizacija bila na visokom nivou i u svakom mi je trenutku bilo jasno što trebam učiniti. Tomu su uvelike pridonijeli CEEPUS koordinatori i Hrvatske i Slovenije, doc. dr. sc. Zoran Vrbanac i mag. Petra Gruden koji su svoj dio posla obavljali odgovorno i na vrijeme, te su mi detaljno i razumljivo pomagali u svim nejasnoćama na koje bih naišla. Također, stipendija je bila dovoljna da pokrije sve troškove studentskog života te sam cijeli period razmjene mogla bezbrižno raditi i učiti.

Svakome bih preporučila odlazak na studentsku razmjenu preko CEEPUS-a. Sve je dobro organizirano, podređeno studentima te su otvorene mnoge prilike za nova poznanstva, znanja i iskustva.

Agata Kučko

Neapolitan Fantastic Beasts
Biodiversity in Campania region

18-25 May 2017



Kanada. Eh?

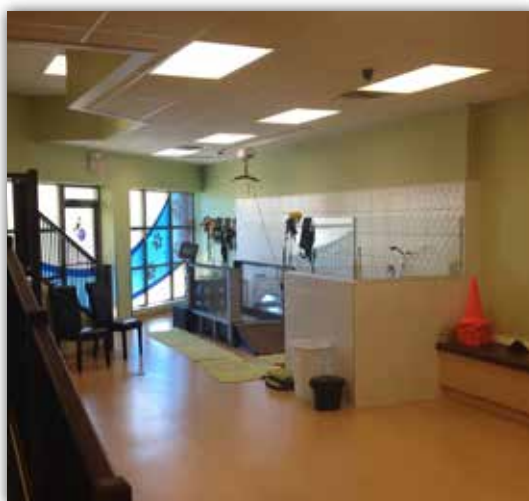
Kao student, tijekom studija, nekak se uvijek pitaš kako je to vani, u velikom svijetu. Tamo di je faks velik kao neki oveći kvart u Zagrebu, tamo gdje imaju sto pacijenata dnevno, gdje ljudi dođu i ne pitaju za cijenu nego vele, sve napravi za mojeg Bu Bua. Mah, gdje roboti preuzimaju stvar u svoje ruke a ti pratiš sve s mobitela. Moje ime je Jurica Tršan, absolvent sam na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, i sad ću malo opisati moje veterinarsko iskustvo u Kanadi.

Eto, spletom okolnosti otišao sam u Kanadu čisto tak, u posjet svojoj sestri koja tamo živi i radi. Prije nego što sam krenuo preko bare, mislio sam si da bi bilo dobro spojiti ugodno s korisnim. Tako sam počeo slati mailove klinikama, koji bi se obično sastojali od toga tko sam, što sam, nekog CV-a, motivacijskog pisma zakaj bi baš tako rado volio raditi kod njih i preporuka. Poslao sam jako puno mailova i mogu iskreno reći, to je bio jedan vrlo depresivan dio. Svi su me redom odbijali, od najboljih klinika koje rade "čuda", do onih "lošijih" koje se uglavnom baze na kastracijama (*spay/neuter clinics*). Šalješ hrpu mailova, a svi odgovori počinju s Dear Mr. Trsan, i taman kad se ponadaš, nabasaš na neku riječ kao *unfortunately* ili *we are sorry...* A niš, što ćeš. Tam iz neke Europe sam, kužim ih. Šalješ dalje mailove jedan za drugim i nadaš se najboljem.

I tako, nakon silnih tih odbijenica moj prvi izbor, London VEC, gdje sam se najviše nadao, zadnji se javio da bih možda mogao doći kod njih. Sreća neviđena! Tko bi rekao...Brzo se spakiram za Pleso (prije neg se predomisle), ukrcam se na avion i za kojih devet sati sletim u Toronto. Izljubio sam sestru i zaputili smo se u London u Ontariju. Prvi radni dan, voditeljica klinike upoznala me s mojom mentoricom koja je *Diplomate* američke veterinarske škole za unutarnje bolesti, radi povremeno na fakultetu kao profesor te je tako pritisak da se ne izblamiram postajao sve veći i veći. Redom me tako voditeljica "pogona" upoznava sa specijalistima iz raznih područja i tehničarima kojih je mali milijun.



Slika 1. Parliament Hill, Ottawa.



Slika 2. Fizikalna terapija.



Slika 3. Kirurgija - priprema.

Slika 4. Westie liječen od dijabetičke ketoacidoze.



Slika 5. Mačak od 17 kg.



Slika 6. Neurološki pregled doge s hidrocefalusom.



Slika 7. Proteza korištena nakon reparacije Ahilove tetive



Svi su ti tehničari završili trogodišnji fakultet i imaju svoju specijalizaciju za neko područje. Imate tako specijaliziranog tehničara koji vam olakšava život na internoj, intenzivnoj, neurologiji, hitnoj, kirurgiji, stomatologiji, fizikalnoj... Onak, čudan osjećaj. Ne moraš mrdnuti ni pristom, nego samo sjediš za kompjutorom u uredu, piješ kavu, čekaš nalaze, slike i razmišljaš kaj bi to moglo biti. Pristup svih doktora bio je takav da ja iznesem svoje mišljenje i predložim daljnju obradu za pacijenta te onda diskutiramo o nalazima i što je dobro ili loše. Naravno, sve to dok pregledavaš pacijenta, a vlasnici čekaju u čekaonici. Dosta sam rano prvi put, praktički tri dana od dolaska, morao donijeti odluku o pacijentu. Uz nadređenu doktoricu na hitnom sam prijemu u dežurstvu zaprimio štene od 3 – 4 mjeseca s izrazitim bolovima u abdomenu i tvrdo elastičnom kvrgom u preponama. Laboratorijske su pretrage pokazivale blagu leukocitozu i dehidraciju, no ultrazvučno se vidjelo da je ingvinalna hernija. Barem sam ja tak mislio. Zoveš kirurga u pola noći da dođe operirati, preispituješ se sto puta jel' to zbilja to, listaš knjige, grizeš nokte. Siguran si da je, ali kaj ak nije? Dolazi kirurg u pidžami, kaže ti, *scrub in*, i onaj kliše "sad ćemo vidjeti koliko si dobar". Fala bogu, bila je hernija s nekrozom crijeva. Resekcija crijeva i sve to kaj ide uz herniju i na kraju operacije čuješ *good call* od kirurga. Za probiti led i upoznavanje, odlično je sve završilo. Unutarnje bolesti bile su jako zanimljive, prvi pacijent s kojim sam se susreo bio je pas s neurološkim znakovima uslijed pasivnog pušenja, opijata. Kasnije sam shvatio da to i nije takva rijetkost tamo u hitnoj. Na unutarnjim bolestima vidio sam puno toga, jako puno infekcija respiratornog sustava, autoimunskih bolesti, razne endoskopije, hormonskih poremećaja, dijabetesa, kemoterapija, virusnih bolesti, UZV-a. Pacijent kojeg se rado sjetim bio je mačak koji je imao 17 kg. Razlog njegove debljine nije se mogao razjasniti jer nije imao nikakvih hormonskih disbalansa, jeo je medicinsku dijetnu hranu, išao je čak na fizikalnu terapiju. Ali jednostavno je bio gojazan i vlasnica je silno brinula zbog njega. Neurologija je također bila jako zanimljiva, uglavnom zbog specijalistice koja je jurila sto na sat i ak je nisi pratio u stopu, ode ona negdje dok ti, s francuskim naglaskom, objašnjava kako funkcionira levitiracetam. Također sam vidio puno

magnetskih rezonancija, epilepsija, neuropatija. Na kirurgiji sam dosta asistirao tijekom operacija, uglavnom raznih ortopedskih zahvata kao što su TPLO, razne osteosinteze, luksacije patele, puknuća ligamenata, ali također i na mekoj kirurgiji gdje sam samo u jednom tjednu asistirao na tri portosistemska šanta. Nažalost, zbog činjenice da su velike životinje sve u *farm country*, izvan grada, otprilike minimalno 45 min vožnje, teško mi je bilo organizirati svakodnevni prijevoz te sam išao samo nekoliko puta u posjet farmama krava. Tamo male farme krava imaju u prosjeku 300 grla, dok velike imaju po tisuću ili više. Jako je zanimljivo vidjeti takav intenzivan sustav uzgoja.

Ovo je bilo jedno izvanredno iskustvo. Vidjeti takav način rada, raditi tamo dva i pol mjeseca i naučiti nove stvari, iskusiti kako je to kad dođeš s kompleksom manjega. I onda kad ti specijalist kaže da nisi ništa lošiji od njih, možda čak bolji u nečemu. Da Europljani uglavnom i znaju bolje. Kad ti jedan specijalist kaže da je jedina razlika platežna moć vlasnika, a ne znanje. Njima novac omogućuje skupe pretrage, hordu tehničara i takve uvjete. Onda shvatiš da nije *Balkan* tak loš, da se vrijedi truditi i biti ustrajan. I tipično pitanje za kraj. Kanada. Eh? Prelijepa zemlja, jako dragi, tolerantni ljudi, dobra klopka. (Isprva mi je bilo, *poutine*, ma daj, tko saft stavlja prek' pomfrita s malo komadića sira gore. Ali zbilja je dobro!). Zemlja mogućnosti. Kome se pruži prilika, moj bi savjet bio da je definitivno ode posjetiti i pokuša izvući maksimum. Ja jesam.

Jurica Tršan



Slika 8. Slapovi Niagare.



Slika 9. Indijski nosorog - Toronto Zoo.



Slika 10. Grand Bend plaža.



Slika 11. Algonquin Provincial Park.

Bok, bok!

I am Klevis Haxhiaj from Albania. I was part of the ERASMUS+ program within which I spent 1 semester at the Faculty of Veterinary Medicine. I am currently in my 3rd year.

Fig. 1 During parasitology practices



Taking part in a student exchange program had been on my wish list for a long time and I could not have been more enthusiastic and happy when I received the Acceptance Letter from the University of Zagreb.

I was asked to share my experience. Of course I have only good things to

share. I honestly had a great and a very valuable time for my future career, as well as for personal benefit. For a start the study conditions are better than in Albania. The faculty has a bigger campus, smaller groups, a large number of practical hours, modern equipment and good interaction with the staff. I really appreciate the Necropsy class as part of the Pathology course. I had never seen a newly dead animal in my lab courses in Albania, so you can imagine how enthusiastic I was about

that. Also, in Parasitology I had the opportunity to use the microscope and to identify the parasites myself, which is something the professor does at my home faculty. One major advantage that you as students have is the possibility to retake the exams several times within a year. We only have 2 opportunities in one year. But there were also situations that I didn't like. For example, the schedule was intense. I don't think I will ever forgive myself for waking up early and swearing because I had to go to classes starting from 7:30 that were in Croatia. I wonder why I had to attend those classes in the first place!

What impressed me a great deal was your warm welcome. I felt so much at ease when I wanted to communicate with someone. I am thankful for your generosity and your help at every moment. Furthermore, I felt very comfortable talking to professors as they were more than willing to answer many of my requests and emails.

There are a lot of fellow students and professors that I should thank. I should really mention the coordinator, prof. Juraj Grizelj, for answering my many questions, prof. Jelena Šuran of Pharmacology for being very collaborative and helpful, prof. Andrea Gudan Kurilj of Pathology and prof. Renata Barić Rafaj of Biochemistry for their dedication.

Overall, I must say for the hundredth time that I really enjoyed this experience. Before coming here, I thought that I would spend most of my time just studying, but that wasn't the case.

Erasmus or any other exchange program is more about networking and socializing. This was by far the best experience, that offered me the opportunity to learn more and have fun in the meantime. This is an amazing opportunity, so guys, use it wisely!

Klevis Haxhiaj

Fig. 2 Erasmus lifestyle. Me and some other foreign students during our Farewell party.





Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

festival znanosti
www.festivalznanosti.hr



*HOCUS POCUS
MEDICINAE
VETERINARIAE*

VRIJEME

24. – 29. 4. 2017.

Radionica će se održati 26.04.2017. u Velikoj dvorani Tehničkog muzeja Nikola Tesla u Zagrebu od 16:00-18:00 sati.

Brod na Kupi • Čabar • Dubrovnik • Krapina • Mali Lošinj • Našice • Ogulin • Opatija • Osijek • Požega • Pula • Rab • Rijeka • Samobor • Sisak • Slavonski Brod • Split • Valpovo • Varaždin • Vukovar • Zadar • Zagreb



UPUTE AUTORIMA

1. Časopis Veterinar objavljuje radove hrvatskih i stranih studenata veterinarske medicine te studenata i stručnjaka iz područja biomedicine i zdravstva te područja biotehnologije. Uz autore, treba biti navedena i ustanova u kojoj studira/radi.
2. Objavljuju se izvorni znanstveni radovi, prikazi slučaja, stručni i pregledni članci, stručne rasprave, sažeci radova, popularizirajući članci te drugi tekstovi znanstvene i stručne tematike. Jednako tako, u časopisu se mogu naći i obavijesti, najave te osvrti na protekla događaja.
3. Tekstovi trebaju biti pisani u MS Wordu, font Times New Roman, veličine fonta 12 pt, proreda 1,5. Članak mora sadržavati minimalno 2 kartice teksta, a maksimalno 10 kartica, ne uključujući slike i priloge. Iznimno, duži tekstovi će se objaviti ako uredništvo bude smatralo da je to neophodno za potpunu prezentaciju sadržaja rada. Sažeci ne smiju prelaziti 20 redova.
4. Uz radove na hrvatskom jeziku moraju se priložiti naslov rada i sažetak na engleskom jeziku, dok se uz radove na engleskom jeziku moraju priložiti naslov rada i sažetak na hrvatskom jeziku.
5. Slike i prilozi se prilažu posebno. Treba izbjegavati trodimenzionalne grafove i priloge koji su nevažni ili manje važni za prezentaciju rada. Slike i prilozi moraju sadržavati redni broj, naslov i izvor prema pravilima citiranja referenci. U tekstu obavezno naznačiti mjesto gdje dolaze.
6. U samom tekstu citirani autori i godina objavljivanja navode se na sljedeći način: a) ako je jedan autor (Nicolet, 1982.), b) ako su dva autora (Smith i Wesson, 2005.), c) ako su tri i više autora (Holmes i sur., 1919.), d) ako se tekstom citira više autora (Van Valkenburgh, 1989.; Popowics, 2003.), e) publikacije istih autora i istih godina (Evans i Sanson, 2005a; Evans i Sanson, 2005b; itd.) .
7. Literatura se navodi na kraju članka i to prema abecednom redu. Navode se samo reference citirane u tekstu i to na sljedeći način:
 - a) Časopisi
ARADAIB, I. E., C. E. SCHORE, J. C. CULLOR, B. I. OSBURN (1998): A nested PCR for detection of North American isolates of bluetongue virus based on NSI genome sequence analysis of BTV- 17. Vet. Microbiol. 59, 99-108.
 - b) Kongresi i simpoziji
WEBSTER, R., L. CAMPITELLI, S. KRAUSS, K. SHORTRIDGE, A. FIORETTI, Y. GUAN, M. PEIRIS, I. DONATELLI (2000): Are chickens playing an increasing role in the ecology of influenza viruses? Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, 27-30 August. Brescia, Italy. str. 34-37.
 - c) Knjige
MURPHY, F. A., E. P. J. GIBBS, M. C. HORZINEK, M. J. STUDDERT (1999): Veterinary Virology, 3rd ed., Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto. str. 405-409.
 - d) Poglavlje u knjizi
NORRED, W. P., K. A. VOSS, R. T. RILEY, R. D. PLATTNER (1996): Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA. U: Fumonisin in Food. (Jackson, L., J. Devries, L. Bullerman, ur.). Plenum Press. New York. str. 225-236.
 - e) Diplomski rad / disertacija
VILLACRES-ERIKSSON, M. (1993): Induction of immune response by iscoms. Disertacija. Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
 - f) Zakoni, pravilnici i sl.
ANONIMUS (2005): Pravilnik o lovostaji. Narodne novine 155/05.
8. Tekst rada u MS Wordu i priloge dovoljne kvalitete da se mogu uspješno reproducirati, treba slati na e-mail adresu veterinar@vef.hr .
9. Rukopise radova ne vraćamo.
10. Radovi koji ne ispunjavaju gore navedene upute uredništvo neće prihvatiti.
11. Uredništvo dostavlja svakom autoru jednu tiskanu verziju časopisa.
12. Radovi objavljeni u časopisu Veterinar dostupni su online na www.vef.hr/veterinar .

SADRŽAJ:

UVOD

- *Riječ urednice* 1

IZVORNI ZNANSTVENI RADOV I

- *Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije* 2
- *Diferencijacija stanica u primarnoj kulturi neurona iz dva soja transgeničnih miševa* 10

STRUČNI RADOV I

- *Prikaz koronarnih arterija ovce na anatomskom preparatu srca primjenom poliuretanske smjese* 21
- *Dijagnostika gravidnosti koza* 28

POPULARIZACIJSKI ČLANCI

- *Udruga studenata veterinarske medicine USVM* 35
- *USVM EQUUS* 36
- *IVSA HRVATSKA European Veterinary Students Seminar* 38
- *European Veterinary Students Seminar, Utrecht 2016.* 39
- *Humanijada* 42
- *Hvala CEEPUS-u za divan rujan u Ljubljani* 43
- *Kanada. Eh?* 44
- *Bok, bok!* 47