

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET ZAGREB

Ines Veršec

KVALITATIVNE I KVANTITATIVNE PROMJENE KRVNIH STANICA GMAZOVA

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za patološku fiziologiju Veterinarskog fakulteta,
Sveučilišta u Zagrebu

PREDSTOJNICA: Prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

MENTORICE: Doc. dr. sc. Maja Belić

Doc. dr. sc. Romana Turk

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Mirna Robić
2. Doc. dr. sc. Maja Belić
3. Doc. dr. sc. Romana Turk
4. Prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas (zamjena)

ZAHVALA

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima i svojoj sestri. Zahvalna sam im za svaku riječ potpore, za svaki poticaj i motivaciju i za beskrajno strpljenje i ljubav koju su mi pružili na mom životnom putu. Hvala Vam što ste se nesebično odricali zbog mene. Hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene i hvala Vam na bezgraničnoj ljubavi koju sam uvijek dobivala od vas.

Također, veliko hvala mojim kolegicama, koje su s vremenom postale prijateljice. Bez Vas nebi bilo kako je sada. Hvala Vam na pomoći kroz studiranje, hvala Vam na savijetima, potpori i glasu razuma koji ste mi bile u puno situacija.

I veliko hvala mojoj dragoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Belić. Bez Vas ovo uistinu nebi bilo moguće. Zahvalana sam što ste u meni prepoznali i vidjeli osobu kakva jesam. Veliko hvala na svojoj pomoći i vremenu koje ste mi nesebično pružali. Hvala Vam što ste vjerovali u mene i veliko hvala na svakoj lijepoj riječi koju ste mi uputili.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. VAĐENJE KRVI.....	2
3. OBRADA KRVI.....	4
3.1. Hematokrit.....	5
3.2. Koncentracija hemoglobina.....	5
3.3. Broj eritrocita.....	5
3.4. Broj leukocita.....	6
3.5. Eritrocitne konstante.....	7
3.6. Izrada i bojenje krvnog razmaza.....	7
4. MORFOLOGIJA I FUNKCIJA KRVNIH STANICA.....	8
4.1. Eritrociti.....	8
4.2. Leukociti.....	9
4.3. Trombociti.....	14
5. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA HEMOGRAM.....	15
6. POREMEĆAJI U KRVNOJ SLICI.....	16
6.1. Anemije.....	16
6.2. Upale i inkluzije.....	17
6.3. Hemoparaziti.....	19
7. ZAKLJUČAK.....	20
8. LITERATURA.....	21
9. SAŽETAK.....	25
10. SUMMARY.....	26
11. ŽIVOTOPIS.....	27

1. UVOD

Porastom popularnosti gmazova kao kućnih ljubimaca, povećao se i njihov broj kao pacijenata u veterinarskim ambulantomama. U svrhu očuvanja zdravlja i dobrobiti ovih životinjskih vrsta potrebno je redovito provoditi zdravstvene preglede. Jedan od osnovnih parametara za procjenu zdravlja životinja, dijagnostiku bolesti i uspješnosti terapije je određivanje krvnih parametara odnosno procjena kompletne krvne slike (POLJIČAK-MILAS, 2012.). U sisavaca se hematološki parametri određuju pomoću hematoloških analizatora u medicinskim laboratorijima ili ambulantomama i zahvaljujući automatiziranom postupku, obrada podataka je vrlo brza, a time i dobivanje željene informacije o hematološkom statusu organizma (JAKŠIĆ, 2009.).

Hematološka pretraga u gmazova je složenija zbog toga što se obrada krvi ne može raditi pomoću komercijalnih hematoloških analizatora nego se većina parametara određuje ručno. Razlog tome je specifičnost i raznolikost u morfologiji i broju krvnih stanica između više od 8000 vrsta gmazova (STACY i sur., 2011.). Sve krvne stanice gmazova posjeduju jezgru što predstavlja problem u automatskoj diferencijaciji stanica. Osim toga, krvna slika gmazova podložna je različitim unutarnjim (spol, dob, stanje hibernacije, doba parenja) i vanjskim čimbenicima (godišnje doba, temperatura, okoliš, prehrana, stres, mjesto vađenja krvi) pod čijim utjecajem se mijenja (CAMPBELL i ELLIS, 2007.).

Unatoč sve većem broju literaturnih podataka o hematološkim i biokemijskim parametrima gmazova (STRIK i sur., 2007.) još uvijek su ti podaci za veliki broj vrsta iz ove porodice životinja nepotpuni.

Hematološkom pretragom najčešće se mogu ustanoviti poremećaji kao što su anemije, upale, parazitemije i promjene hematopoetskog tkiva.

Kompletna krvna slika gmazova obuhvaća crvenu i bijelu krvnu sliku. Crvenu krvnu sliku čine ukupan broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina i eritrocitne konstante, a bijelu ukupan broj leukocita, diferencijalna krvna slika te morfološka procjena krvnih stanica.

2. VAĐENJE KRVI

Između različitih vrsta gmazova postoje velike varijacije u veličini, od male kornjače koja teži svega nekoliko grama do iguane koja teži nekoliko kilograma (pa i većih životinja kao što su npr. krokodili koje nalazimo u prirodi ili zoo vrtovima, a mogu težiti i do 700 kg) (JENKINS–PEREZ, 2012.). Ukupan volumen krvi u gmazova je 5-8% tjelesne mase, a najviše je dozvoljeno izvaditi 10% od ukupnog volumena krvi u zdrave životinje (CAMPBELL i ELLIS, 2007.). Primjerice, ako zmija teži 100 grama, ima ukupno 5-8 ml krvi, od čega možemo sigurno uzeti 10% što iznosi 0,5-0,8 ml krvi (JENKINS-PEREZ, 2012.).

Mjesto venepunkcije, antikoagulans te moguća upotreba anestetika određuje se za svaku vrstu odnosno svaku životinju posebno.

Kod svih gmazova limfne žile često prate krvne žile, te je stoga najčešći problem prilikom vađenja krvi gmazova miješanje krvi sa limfom jer se često dogodi da se uz krvnu probije i limfna žila. U tom slučaju na vrhu brizgalice pojaviti će se bistra tekućina prije krv. Kako limfa može utjecati na broj stanica u krvi što rezultira smanjenim hematokritom, brojem eritrocita i leukocita te smanjenom koncentracijom hemoglobina, potrebno je postupak vađenja krvi ponoviti.

Kao antikoagulans često se koristi litijum heparin jer EDTA koja je češći antikoagulans u hematologiji sisavaca uzrokuje hemolizu stanica u nekih vrsta gmazova, naročito kornjača (SYKES i KLAPHAKE, 2008.).

Zmije

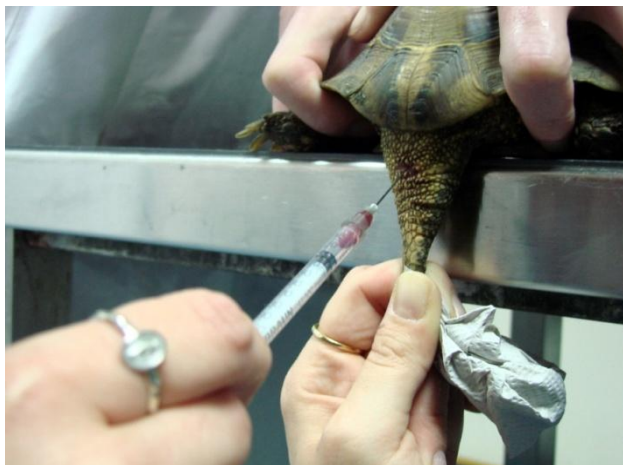
Najčešće mjesto venepunkcije u zmija je ventralna repna vena u području blizu kloake. Prilikom venepunkcije potrebno je kod mužjaka paziti da ne dođe do oštećenja penisa ili mirisnih žlijezdi. Kod malih zmija ili ako je potrebna veća količina krvi, krv se može vaditi i iz srca. U tom slučaju zmiyu je potrebno kratko sedirati, a srce točno locirati Doppler ultrazvukom (JENKINS-PEREZ, 2012.).



Slika 1. Vađenje krvi iz ventralne repne vene zmiје. Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Kornjače

Za kornjače je opisano nekoliko mogućih mjesta venepunkcije: jugularna vena, okcipitalni sinus, subvertebralni venozni sinus i dorzalna repna vena. Prilikom vađenja krvi iz venoznih sinusa potrebno je paziti kako ne bi došlo do miješanja krvi sa limfom, budući da na tim mjestima limfne i krvne žile čine zajednički splet. Najčešće se krv vadi upravo iz dorzalne repne vene dok se iz jugularne vene češće vadi krv vodenim kornjačama i nerijetko uz sedaciju (JENKINS-PEREZ, 2012.).



Slika 2. Vađenje krvi iz dorzalne repne vene kornjače. Izvor: arhiva Zavod za patološku fiziologiju

Gušteri

Mjesto venepunkcije u guštera je ventralna repna vena do koje je moguće doći ubodom igle lateralno ili ventralno. Ako je potrebno, prije vađenja krvi, moguće je životinji staviti povez sa vatom oko očiju uz lagani pritisak na očne jabučice kako bi je se umirilo bez upotrebe kemijskih sredstava. Kod guštera koji imaju mogućnost repne autotomije (SYKES and KLAPHAKE, 2008.) odnosno odbacivanja (amputacije) repa kao obrambeni mehanizam, životinju je potrebno sedirati kako ne bi došlo do samoozljeđivanja.

3. OBRADA KRVI

Nakon vađenja krvi potrebno je odmah napraviti krvne razmaze prije nego hemoparaziti napuste krve stanice. Idealno je krvne razmaze raditi direktno iz krvi koja je još u brizgalici i nije pomiješana sa antikoagulansom. Ostatak krvi se iz brizgalice premijesti u ependorfice sa antikoagulansom. Određivanje krvnih parametara najbolje je napraviti što prije nakon vađenja krvi jer stajanjem krvi dolazi do kvalitativnih i kvantitativnih promjena krvnih stanica što utječe na konačan nalaz krvne slike.

3.1. Hematokrit

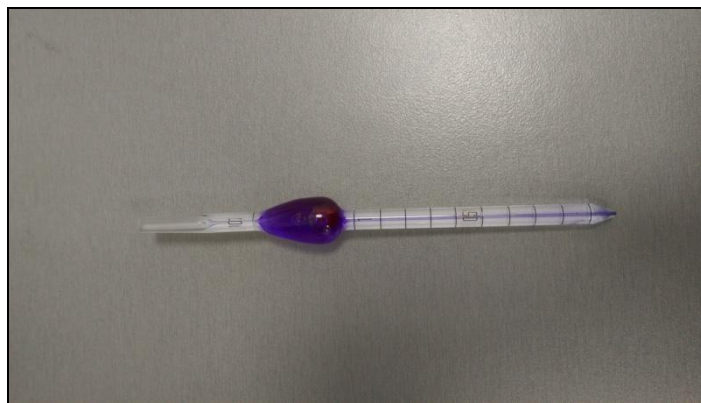
Hematokrit je udio stanica u ukupnom volumenu krvi. Određuje se pomoću mikrocjevčica i mikrocentrifuge. Nakon centrifugiranja na čitaču se očita hematokrit i izražava u postocima. Kod gmazova se hematokrit kreće od 20 – 40% što je niže nego u sisavaca i ptica i ukazuje na smanjeni kapacitet prijenosa kisika (STACY i sur., 2011.).

3.2. Koncentracija hemoglobina

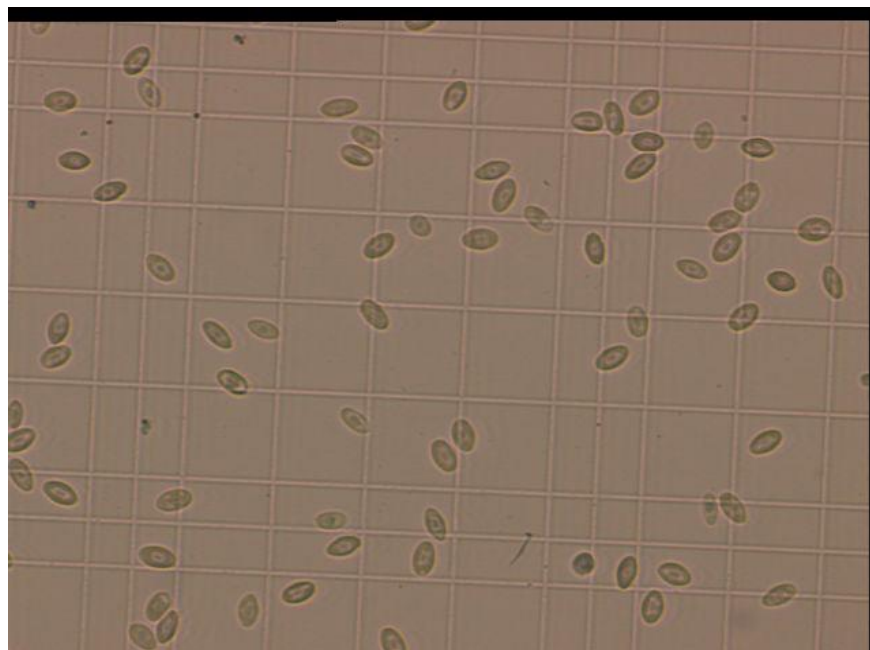
Metoda koja se koristi za određivanje koncentracije hemoglobina je najčešće spektrofotometrijska metoda sa cijanomethemoglobinskim reagensom. Prije mjerenja apsorbancije na spektrofotometru potrebno je krv koja je pomiješana sa reagensom centrifugirati kako jezgre iz hemoliziranih eritrocita ne bi utjecale na optičku gustoću. Koncentracija hemoglobina u gmazova je vrlo često niska i kreće se ispod 10 g/dL (CAMPBELL i ELLIS, 2007.).

3.3. Broj eritrocita

Ukupan broj eritrocita se u gmazova određuje manualnom metodom pomoću melanžera, Natt-Herrick-ove otopine i Neubauerove komorice u kojoj se na 5 srednje velikih kvadratića broje eritrociti pod mikroskopskim povećanjem 40x. Dobiveni broj eritrocita se pomnoži sa 10000 i izražava kao broj eritrocita $\times 10^6/L$. (WEISS i WARDROP, 2010.).



Slika 3. Eritrocitni melanžer. Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju



Slika 4. Brojenje eritrocita u Neubauerovoj komorici, mikroskopsko povećanje 40x.
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

3.4. Broj leukocita

Postoji nekoliko metoda za određivanje ukupnog broja leukocita (CAMPBELL i ELLIS, 2007.). Svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke, a točnost rezultata ovisi o iskustvu citologa/hematologa.

U prvoj metodi broj leukocita može se odrediti istovremeno kad i broj eritrocita, s time da leukocite izbrojimo na području čitave mrežice. Ukupan broj leuk/ μL = (svi leukociti u 9 kvadrata + 10% od ukupnog broja leukocita) x 200. Korištenjem ove metode za ukupan broj leukocita događaju se mnoge pogreške kao što su neadekvatno miješanje ili razrjeđivanje krvi i boje, nepravilno punjenje komorice, zamjena leukocita za trombocite (koji su isto sa jezgrom). Zato se radi i određivanje ukupnog broja leukocita prilikom gledanja krvnog razmaza (STRIK i sur., 2007.).

Razmaz se može gledati pod mikroskopskim povećanjem 40x i izbroje se leukociti u 10 vidnih polja. Srednja vrijednost izbrojanih leukocita se pomnoži sa 2000 i dobivamo

ukupan broj leukocita/ μL . Kod druge metode razmaz se gleda pod imerzionim povećanjem 1000x. Ukupan broj leukocita po mm^3 dobiva se kada prosječan broj leukocita izbrojanih na 5 vidnih polja podijelimo sa 1000 i pomnožimo sa 3,500 000 (JENKINS-PEREZ, 2012.).

3.5. Eritrocitne konstante

Eritrocitne konstante su:

MCV (eng. mean corpuscular volume, prosječan volumen eritrocita). Izražava se u fL, a formula kojom se izračunava je: $(\text{hematokrit} \times 10) / \text{broj eritrocita}$

MCH (engl. mean corpuscular hemoglobin, prosječna količina hemoglobina u eritrocitima). Mjerna jedinica je pg, a formula je: $(\text{hemoglobin} \times 10) / \text{broj eritrocita}$

MCHC (engl. mean corpuscular hemoglobin concentration, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima). Formula je: $(\text{hemoglobin} \times 100) / \text{hematokrit}$. Rezultat se izražava u mg/dL. (STRIK i sur., 2007.).

Eritrocitnim konstantama dobivamo uvid u veličinu eritrocita i njihovu zasićenost hemoglobinom.

3. 6. Izrada i bojenje krvnog razmaza

Kao što je već rečeno, krvne razmaze najbolje je napraviti odmah tijekom vađenja krvi, direktno iz igle, po mogućnosti sa krvi koja još nije pomiješana sa antikoagulansom kako bi spriječili eventualno negativno djelovanje antikoagulansa na krvne stanice (npr. hemolizu). Krvne razmaze potrebno je dobro osušiti na zraku nakon čega ih se može obojati. Razmazi se boje Wrightovim bojanjem (WEISS i WARDROP, 2010.).

4. MORFOLOGIJA I FUNKCIJA KRVNIH STANICA

4.1. Eritrociti

Zreli eritrociti gmazova su ovalne stanice koje u središtu sadrže ovalnu do okruglu jezgru nepravilnih rubova. Wrightovim bojanjem ove stanice se boje rozo-narančasto, a u jezgri je vidljiv gusti ljubičasti kromatin. Životni vijek eritrocita gmazova je 600-800 dana što je znatno više nego u sisavaca u kojih eritrociti žive u prosjeku 120 dana (CAMPBELL i ELLIS, 2007.). U krvi zdravih gmazova često se može naći i niži postotak polikromatofila (manje od 3%) (SYKES i KLAPHAKE, 2008.). Za razliku od polikromatofila u sisavaca, u gmazova su ove stanice manje od zrelih eritrocita, okruglije su, boje se više bazofilno i imaju veću jezgru od zrelog eritrocita (STACY i sur, 2011.). Ove stanice mogu se vidjeti i kod zdravih, mladih životinja te kod zmija tijekom presvlačenja (CAMPBELL i ELLIS, 2007.).

Broj eritrocita najčešće je u gmazova smanjen tijekom anemija o čemu će više biti riječ u slijedećem poglavlju.



Slika 5. Eritrociti crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

4.2. Leukociti

Leukociti gmazova dijele se u dvije osnovne skupine: granulociti i mononuklearne stanice ili agranulociti. Granulocite prema bojenju i obliku granula dijelimo na heterofile, eozinofile i bazofile, dok agranulocite dijelimo na monocite, limfocite i azurofile. Postoje brojne varijacije kod različitih vrsta gmazova u broju leukocita, morfologiji granula te njihovoj koncentraciji u perifernoj krvi (STACY i sur, 2011.).

Heterofili

Heterofili su velike, okrugle stanice kojima je citoplazma ispunjena svjetlim rozo-narančastim granulama najčešće štapićastog oblika. Jezgra heterofila varira u obliku i može biti okrugla, ovalna (najčešće u zmija i kornjača), ali i segmentirana (u guštera) (STACY i sur., 2011.). Heterofili su funkcionalno najbliži neutrofilima u sisavaca. Obavljaju fagocitozu bakterija i stranih tvari i imaju važnu ulogu u urođenoj imunosti. Najčešće su zastupljeni 30-45% od svih leukocita u perifernoj krvi, a u nekih vrsta kornjača i krokodila može ih biti i više od 50%.

Tijekom upala, nekroza i bakterijskih infekcija u perifernoj krvi nalazimo toksične neutrofile. Stupanj toksičnosti heterofila ovisi o težini bolesti. Toksični heterofili imaju bazofilnu citoplazmu, degranulaciju, a tijekom teških upala mogu se u citoplazmi naći vakuole, pleomorfne granule i jaka reznjevitost jezgre. Kao i kod sisavaca, prisustvo nezrelih heterofila (skretanje u lijevo) je uglavnom povezano sa upalom.

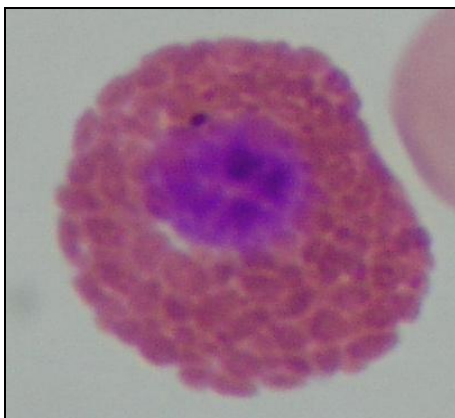
Eozinofili

Eozinofili gmazova su morfološki i funkcionalno slični onima u sisavaca. To su okrugle srednje velike do velike stanice koje u citoplazmi imaju okrugle roze granule. Granule se u nekih vrsta guštera boje plavo zeleno. Jezgra može biti smještena centralno ili ekscentrično, a oblikom varira od okrugle do ovalne i izdužene. Vrlo su rijetki u zmija, a neki autori smatraju da ih zmijske niti nemaju, osim Kraljevske kobre (STACY i sur., 2011.).

U perifernoj krvi eozinofili čine 7-20% ukupnih leukocita s time da ih gušteri imaju manje, a kornjače više. Smatra se da je funkcija eozinofila u gmazova slična onoj u sisavaca jer je njihov povećan broj zamijećen kod parazitarnih invazija, ali i ostalih tipova antigene stimulacije.



Slika 6. Heterofil čančare (*Testudo hermanni*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

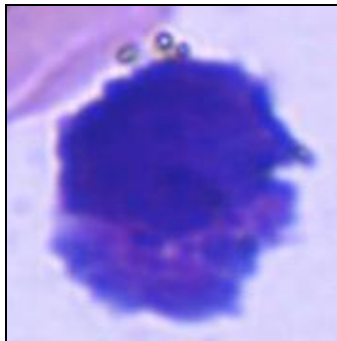


Slika 7. Eozinofil čančare (*Testudo hermanni*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Bazofili

Bazofili su u pravilu najmanji granulociti, no u nekih vrsta mogu biti veliki poput heterofila. U citoplazmi sadrže veliki broj malih, okruglih, tamno ljubičastih granula koje često prekrivaju jezgru koja je često smještena ekscentrično i uglavnom je okrugla. Tijekom vađenja i obrade krvi granule mogu degranulirati.

Za razliku od sisavaca, gmazovi uglavnom imaju veliki broj bazofila. Ovisno o vrsti, bazofila u perifernoj krvi zdravih životinja može biti i do 40% od ukupnih leukocita. Iako im funkcija nije dobro poznata uočeno je da im se broj se poveća tijekom hemoparazitskih i virusnih infekcija (STACY i sur., 2011.). Prilikom diferencijacije stanica potrebno je paziti da se bazofili ne zamijene sa toksičnim heterofilima koji imaju bazofilne i okrugle granule (SYKES i KLAPHAKE, 2008.).



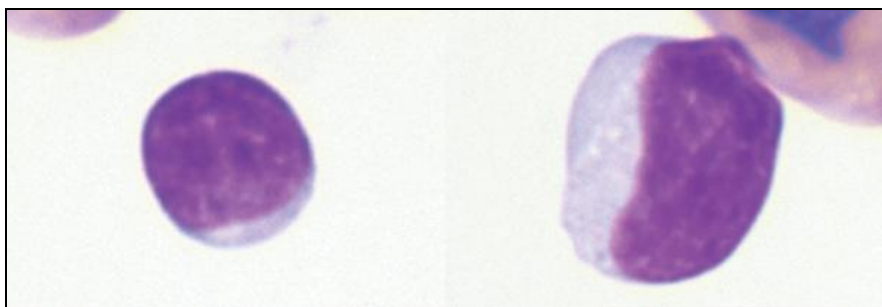
Slika 8. Bazofil crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Limfociti

Limfociti gmazova su vrlo slični onima u sisavaca. To su okrugle stanice koje variraju u veličini, pa nalazimo velike, srednje i male limfocite. Jezgra je okrugla i nalazi se centralno u stanici ili blago ekscentrično, a citoplazma je bazofilna i oskudna u odnosu na jezgru. Prilikom diferencijacije leukocita potrebno je paziti kako se mali limfocit morfološki ne bi zamijenio za trombocit.

U stanjima koja izazivaju imunološki odgovor u perifernoj krvi povremeno možemo vidjeti velike limfocite, reaktivne limfocite i limfoblaste. Limfociti gmazova se kategoriziraju kao B- i T- limfociti koji izlučuju imunoglobuline i imaju ulogu u stanično posredovanoj imunosti.

U većine gmazova limfociti su dominirajući leukociti čiji udio može biti čak i do 80%. Limfocitoza se javlja kod upala, infekcija, cijeljenja rana, parazitemija i virusnih bolesti, dok limfopenija može biti povezana sa malnutricijom i većom količinom endogenih ili egzogenih kortikosteroida (STACY i sur., 2011.)

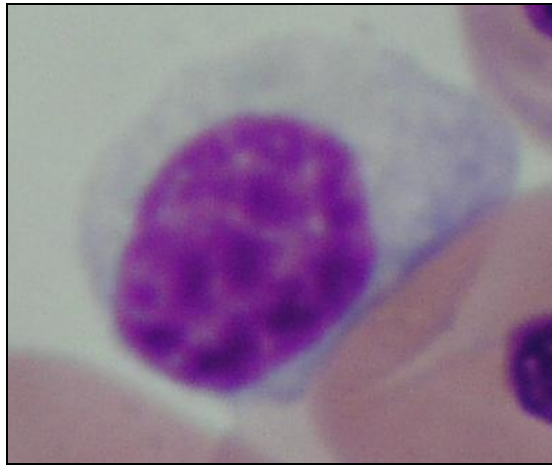


Slika 9. Limfociti zmije Crna štakorašica (*Pantherophis obsoletus*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Monociti

Monociti su uglavnom velike stanice, okruglog ili ovalnog oblika sa obilnom blijedo plavom citoplazmom i nepravilnom jezgrom. Reaktivni monociti često sadrže i vakuole, a može se vidjeti i fagocitirani materijal te fine eozinofilne ili azurofilne granule (CAMPBELL i ELLIS, 2007.). Najčešće ih ima do 10% u ukupnom broju leukocita, mada neki gmazovi mogu imati i do 20% monocita. Nakon što izađu iz periferne cirkulacije i uđu u tkiva, monociti se razvijaju u makrofage. Povišen broj monocita u perifernoj krvi javlja se tijekom kronične stimulacije antigenom, kronične upale, te bakterijskih i parazitarnih bolesti.

Specifičnost kod gmazova je da se u perifernoj krvi mogu uočiti monociti i makrofagi koji sadrže pigment melanin, lipidne vakuole ili eritrocite što se ne smije zamijeniti sa intracelularnim organizmima (STACY i sur., 2011.).

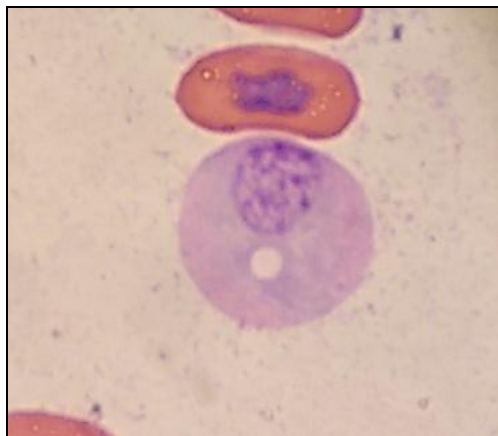


Slika 10. Monocit barske kornjače (*Emys orbicularis*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Azurofili

Azurofili su krvne stanice specifične samo za gmazove. U krvi guštera, kornjača i krokodila nalazimo ih u manjem broju, dok su u zmija oni druge stanice po učestalosti u perifernoj krvi (CAMPBELL i ELLIS, 2007.). U zmija fiziološki može biti i do 35% azurofila od ukupnih leukocita. Morfološki i funkcionalno su slični i monocitima i granulocitima. To su okrugle stanice sa blijedom plavičasto-sivom citoplazmom u kojoj se nalaze brojne sitne azurofilne do ljubičaste granule, a nekad i vakuole.

Povišen broj azurofila u zmija je povezan najčešće sa upalnim i infekcijskim bolestima, naročito u akutnim fazama. U ostalih vrsta gmazova broj azurofila češće je povezan sa kroničnim stanjima (STACY i sur., 2011.).



Slika 11. Azurofil zmije Crna štakorašica (*Pantherophis obsoletus*). Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

4.3. Trombociti

Za razliku od trombocita sisavaca koji su citoplazmatski fragmenti megakariocita, trombociti gmazova su stanice sa jezgrom koje potječu iz tromboblata u hematopoetskom tkivu. To su male, ovalne stanice sa blijedo plavom citoplazmom u kojoj se mogu naći vrlo fine i sitne ružičaste granule. Jezgra je okrugla do ovalna i

smještena centralno. Morfološki su slični malim limfocitima zbog čega se mora biti oprezan tijekom diferencijacije stanica. Trombociti su nešto manji od limfocita, ovalniji i imaju svjetliju citoplazmu, a kromatin u jezgri nije toliko zgusnut kao kod limfocita. Pomoć pri diferencijaciji može biti i svojstvo trombocita da se na preparatu nakupljaju u grozdove, a mogu imati i pseudopodije ili sadržavati vakuole u citoplazmi.

Trombociti imaju ulogu u hemostazi i cijeljenju rana, a imaju i sposobnost fagocitoze, pa u aktiviranom stanju mogu fagocitirati bakterije, hemosiderin i eritrocite (STACY i sur., 2011.). Budući da se trombociti u hepariniziranoj krvi često grupiraju u nakupine nalik grozdovima nije moguće napraviti točnu procjenu njihovog broja. Osoba koja pregledava krvni razmaz može na temelju iskustva subjektivno procijeniti da li je broj trombocita promijenjen.

5. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA HEMOGRAM

Postoje brojni čimbenici koji utječu broj i morfologiju krvnih stanica. Neki od čimbenika vezani su za samu osobitost jedinke i vrste kojoj pripada (npr. spol, dob, reproduktivan status i sl.) i nazivaju se unutarnji čimbenici. Na njih je nemoguće utjecati, pa je od velike koristi da osoba koja interpretira krvne nalaze bude upoznata sa njima kako ne bi došlo do pogrešne interpretacije.

Kod nekih odraslih vrsta krokodila ustanovljeno je da imaju viši broj eritrocita i znatno niži postotak limfocita u odnosu na mlade životinje (STACY i WHITAKER, 2000.) S druge strane u mladim loggerhead turtles uočen je viši postotak limfocita i niži postotak heterofila u perfernoj krvi u odnosu na odrasle životinje (KAKIZOE i sur., 2007.).

Što se tiče spola, u nekih vrsta kornjača uočene su više vrijednosti parametara crvene krvne slike u mužjaka u odnosu na ženke (CHRISTOPHER i sur., 1999.; ZAIAS i sur., 2006.).

Vanjski čimbenici su godišnje doba, temperatura zraka, dostupnost i vrsta hrane, hibernacija, zatočeništvo i stres.

Općenito je u većine gmazova uočen povećani broj eritrocita nakon hibernacije (u proljeće) nego prije hibernacije (u jesen) (MACHADO i sur., 2006.). Također je zabilježen veći broj heterofila, a manji broj eozinofila po ljeti u odnosu na period hibernacije (FRYE, 1991.; PERPINAN i sur., 2006.; STRIK i sur., 2007.). Postotak limfocita bio je niži tijekom zimskog perioda od ljetnih mjeseci (PIERSON, 2000.; CAMPBELL i ELLIS, 2007.).

Stres kao jedan od čimbenika koji utječu na krvnu sliku dovodi u gmazova do povećanja hematokrita i koncentracije hemoglobina (FRANKLIN i sur., 2003.).

6. POREMEĆAJI U KRVNOJ SLICI

6.1. Anemije

Pri intepretaciji crvene krvne slike i dijagnozi anemije kod gmazova potreban je oprez i dobro poznavanje fiziologije i hematologije ovih životinja. Neki gmazovi imaju fiziološki nizak hematokrit (16-21%) kao npr. pitoni (JOHNSON i BENSON, 1996.), a klinički znakovi koji bi ukazivali na anemiju često mogu biti prikriveni. Primjer za to su sluznice koje su u većine gmazova pigmentirane, blijede ili zamučene čak i kod zdravih životinja, a većina gmazova koji boluju od neke bolesti su u pravilu letargični bez obzira na uzrok.

Anemija u gmazova mogu biti regenerativna i neregenerativna.

Regenerativna anemija najčešće nastaje kao posljedica krvarenja i/ili hemolize, dok neregenerativna nastaje zbog smanjene produkcije eritrocita u hematopetskom tkivu (CAMPBELL i ELLIS, 2007.).

Anemije zbog krvarenja nastaju najčešće zbog parazita koji sišu krv (krpelji, grinje, pijavice) i traumatskih ozljeda (npr. ugriz druge životinje, pad sa balkona, progutana udica u probavnom sustavu itd.). Hemolitičke anemije uzrokovane su uglavnom hemoparazitima, te bakterijama i toksinima koji imaju hemolitičko djelovanje. Regenerativni odgovor očituje se u krvi bazofilnom punktacijom, dvostrukom jezgrom, povećanom anizocitozom i anizokariozom, te povećanim brojem mitotičkih oblika.

Međutim, sve navedeno može se javiti i poslije hibernacije, kod malnutricije, gladovanja, trovanja, septikemije i teških upalnih bolesti, a posljedica je neregenerativna anemija. Povećan broj retikulocita i ranijih nezrelih stadija eritrocita ukazuje na regenerativni odgovor isto kao i smanjenje vrijednosti MCV i MCHC (STACY i sur., 2011.)

Neregenerativna anemija se u gmazova javlja tijekom kroničnih bolesti i to je ujedno najčešći oblik anemije u gmazova. Najčešće zabilježene bolesti koje prati neregenerativna anemija su kronične degenerativne ili upalne bolesti jetre, bubrega, slezene i pluća, zatim gastrointestinalne bolesti, nepravilno držanje životinje, izgladnjivanje i hematopoetske neoplazme (STACY i sur., 2011.).

6.2. Upale i inkluzije

Upalni odgovor u gmazova je pod utjecajem različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika, u prvom redu temperaturom, godišnjim dobima i hormonalnim učinkom (TUCUNDUVA i sur., 2001.; STRIK i sur., 2007.). Viša temperatura okoliša stimulira imunološki odgovor životinje i može rezultirati ranijom rezolucijom upale (STRIK i sur., 2007.)

Glavni uzrok leukocitoze u gmazova su upalna stanja koja se javljaju tijekom bakterijskih i parazitarnih zaraznih bolesti, oštećenja tkiva i nekroze (STRIK i sur., 2007.; SYKES i KLAPHAKE, 2008.). U pravilu se uvijek javlja heterofilija koja je kod bakterijske infekcije uvijek praćena skretanjem u lijevo i toksičnim promjenama heterofila. Uz to se često javljaju monocitoza i azurofilija. Ako je infekcija vrlo jaka u konačnici može rezultirati heteropenijom sa toksičnim skretanjem u lijevo. Teška heteropenija zabilježena je u čančara nakon administracije fenbendazola (NEIFFER i sur., 2005.).

Upala u gmazova često rezultira stvaranjem granuloma koji sastoji od gusto posloženih nekrotičnih heterofila u centru te monocita, makrofaga i multinuklearnih gigantskih stanica na periferiji (TUCUNDUVA i sur., 2001.). Ako su prisutni limfociti i plazma stanice, oni ukazuju na kronicitet lezije.

U zmija je azurofilija sa ili bez toksičnog skretanja u lijevo često povezana sa upalnim ili заразним (najčešće bakterijskim) bolestima, naročito u aktunoj fazi. U ostalih

vrsta gmazova azurofilija je češće prisutna u kroničnim stanjima (JACOBSON i sur., 1997.)

Virusne infekcije su česte u gmazova, a neke se mogu dijagnosticirati promatranjem karakterističnih virusnih inkluzija u citoplazmi krvnih stanica. Pritom se mora paziti da se virusne inkluzije ne zamijene sa kristalima hemoglobina, artefaktima prilikom bojanja razmaza, fagocitiranim komadićima, hemosiderinom ili melaninskim granulama (STACY i sur., 2011.).

Inclusion Body disease (IBD) je bolest zmija, najčešće udavki, kod koje se u limfocitima nalaze karakteristične citoplazmatske inkluzije (STRIK i sur., 2007.). Smatra se da je uzrokuje retrovirus, ali buduća istraživanja to tek trebaju potvrditi. Bolest se karakterizira limfocitozom i već spomenutim intracitoplazmatskim inkluzijama u limfocitima, rijeđe u trombocitima i bazofilima. Inkluzije su glatke, homogene, blijedo plavičaste i često ispunjavaju citoplazmu, a mogu pomaknuti jezgru. Osim u limfocitima inkluzije IBD-a nalazimo i u ostalim stanicama kao npr. neuronima i glija stanicama središnjeg živčanog sustava, epitelnim stanicama sluznice probavnog trakta, hepatocitima, renalnim tubularno epitelnim stanicama i gušterači (JACOBSON i sur., 2001.)

Inkluzije kod infekcije Iridovirusom uočene su u krvnim stanicama zmija, guštera i kornjača (ALLENDER i sur., 2006.; WELLENHAN i sur., 2008.). Morfologija ovih inkluzija varira u različitim vrsta gmazova. Iako je infekcija patogena za životinje, zabilježeni su nalazi inkluzija u cirkulirajućim eritrocitima bez vidljivog štetnog učinka (DALY i sur., 1980.).

U zmija se ovaj virus naziva zmijski eritrocitni virus (engl. snake erithrocyte virus (SEV)) i uvijek je povezan sa jakom anemijom (ALVES de MATOS i sur., 2002.; WELLENHAN i sur., 2008.)

6.3. Hemoparaziti

Većina hemoparazita u gmazova nije patogena i često se mogu uočiti u zdravih životinja koje žive u prirodi. Patogeni hemoparaziti izazivaju hemolitičku anemiju naročito kad je jedan od okidača za nastanak bolesti stres.

Hemogregarini su morfološki slični krvni paraziti iz četiri različita roda. Nalazimo ih u većine vrsta gmazova, ali ih ne možemo difrencirati samo na osnovi morfoloških svojstava. Gametocite hemogregarina se jednostavno mogu identificirati u citoplazmi eritrocita. To su duguljasti organizmi sa blijedo plavom citoplazmom i centralno okruglo do ovalnom jezgrom koji se najčešće sještaju oko jezgre eritrocita i često je pomiču u stranu. Općenito se hemogregarini ne smatraju patogenim, ali u neprimjerenom i stranom domaćinu mogu izazvati značajan imunološki odgovor.

U gmazova je opisano više od 90 vrsta i podvrsta *Plasmodiuma*. Gametociste *Plasmodiuma* su vrlo slične onima od hemogregarina, sa razlikom što većina malaričnih parazita sadrži refraktilne, zlatno-smeđe granule. Većina *Plasmodia* u gmazova nije patogeno mada su u nekim slučajevima zabilježene teške anemije (STACY i sur., 2011.).

Trypanosome su ekstracelularne protozoe, bičaći, koji u gmazova uzrokuju doživotnu kliničku infekciju, ali rijetko kad kliničku bolest.

7. ZAKLJUČAK

Kako bi napravili dobru hematološku obradu krvi gmazova, nužno je dobro poznavati ručne metode obrade krvi, morfologiju krvnih stanica i utjecaj različitih čimbenika na određivane krvne parametre.

Uz sve navedeno i s obzirom na raznolikost između velikog broja vrsta gmazova, određivanje i procjena krvne slike gmazova u rutinskoj veterinarskoj kliničkoj praksi za sada još nije ustaljena. Iako je do sada istražen velik broj različitih vrsta gmazova kojima su određene referentne vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara još uvijek su na ovom području potrebna daljnja istraživanja kako bi se što brže, jednostavnije i efikasnije obradila krv gmazova, dobili pouzdani rezultati te nakon toga točno interpretirali nalazi.

8. LITERATURA

1. ALLENDER, M. C., M. M. FRY, A. R. LRIZARRY, ET AL. (2006): Intracytoplasmic inclusions in circulating leukocytes from an eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*) vwith iridoviral infection. J. Wildl. Dis 42(3), 677-684.
2. ALVES DE MATOS, A. P., I. PAPERNA, E. CRESPO (2002): Experimental infection of lacertids with lizard erythrocytic viruses. Intervirology 45, 150-159.
3. CAMPBELL, T., C. ELLIS (2007): Avian and exotic animal hematology and cytology. 3rd ed., Ames, Iowa: Blackwell. pp. 51-81.
4. CHRISTOPHER, M. M., K. H. BERRY, I. R. WALLIS, ET AL. (1999): Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave desert. J. Wildl. Dis. 35, 212-238.
5. DALY, J. J., M. MAYHUE, J. H. MENNA, ET AL. (1980): Virus-like particles associated vwith *Pirhemo- cyton* inclusion bodies in the erythrocytes of a water snake, *nerodia erythrogaster flavigaster*. J. Parasitol. 66, 82-87.
6. FRANKLIN, C. E., B. M. DAVIS, S. K. PEUCKER, ET AL. (2003): Comparison of stress induced by manual restraint and immobilisation in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. J. Ex.p Zoolog. A. Comp. Exp. Biol. 298(2), 86–92.
7. FRYE, F. L. (1991): Hematology as applies to clinical reptile medicine. In: Frye FL, editor. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd edition. Malabar (FL): Krieger Publishing Co., p. 209–279.

8. JACOBSON, E. R., H. P. ADAMS, T. W. GEISBERT, ET AL. (1997): Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Vet. Pathol.* 34, 450-459.
9. JACOBSON, E. R., J. OROS, S. J. TUCKER, ET AL. (2001): Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. *Am. J. Vet. Res.* 62, 217-224.
10. JAKŠIĆ, B. (2009): Klinička važnost novih parametara krvnih stanica. *Biochem. Med.* 19, 38-39.
11. JENKINS-PEREZ, J. (2012): Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. *Veterinary technician.*
12. JOHNSON, J. H., P. A. BENSON. (1996): Laboratory reference values for a group of captive Ball Pythons (*Python regius*). *Am. J. Vet. Res.* 57(9), 1304–1307.
13. KAKIZOE, Y., F. SAKAOKA, F. KAKIZOE, ET AL. (2007): Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 38, 77-84.
14. MACHADO, C. C., L. F. N. SILVA, P. R. R. RAMOS, ET AL. (2006): Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in Brazilian Boa constrictor amarali. *J. Zoo. Wildl. Med.* 37(4), 487–491.
15. NEIFFER, D. L., D. LYDICK, K. BURKS, ET AL. (2005): Hematologic and plasma biochemical changes associated with fenbendazole administration in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 36, 661-672.

16. PERPINAN, D., S. M. HERNANDEZ-DIVERS, M. MCBRIDE, ET AL. (2006): Comparison of three different techniques to produce blood smears from green iguanas, *Iguana iguana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 16(3), 99–101.
17. PIERSON, F. W. (2000): Laboratory techniques for avian hematology. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain C, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 5th edition. Philadelphia. LippincottWilliams and Wilkins. p. 1145-1147
18. POLJIČAK-MILAS, N. (2012): Uvod u hematološke pretrage, web predavanje; [file:///D:/My%20Documents/Downloads/uvod_u_hematoloske_pretrage%20\(3\).pdf](file:///D:/My%20Documents/Downloads/uvod_u_hematoloske_pretrage%20(3).pdf)
19. STACY, B. A., N. WHITAKER. (2000): Hematology and blood chemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31, 339-347.
20. STACY, N., A. R. ALLEMAN, K. SAYLER (2011): Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31, 87-108.
21. STRIK, N. I., A. R. ALLEMAN, K. E. HARR (2007): Circulating inflammatory cells. U: *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text* (Jacobson, E. R. Eds.). CRC Press. pp. 167-218.
22. SYKES, J. M., E. KLAPHAKE (2008): Reptile hematology. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 11, 481-500.
23. TUCUNDUVA, M., P. BORELLI, J. R. SILVA. (2001): Experimental study of induced inflammation in the Brazilian Boa (*Boa constrictor constrictor*). *J. Comp. Pathol.* 125, 174-181.

24. WEISS, D.J., K. J. WARDROP (2010): Schalm's veterinary hematology. 6th ed., Wiley- Blackwell.
25. WELLEHAN, J. F. X. JR., N. I. STRIK, B. A. STACY, ET AL. (2008): Characterization of an erythrocytic virus in the family Iridoviridae from a peninsula ribbon snake (*Thamnophis sauritus sackenii*). Vet. Microbiol. 131, 115-122.
26. ZAIAS, J., T. NORTON, A. FICKEL, ET AL. (2006): Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. Vet. Clin. Pathol. 35(3), 321-325.

9. SAŽETAK

Hematologija gmazova je područje koje se u posljednjih nekoliko desetljeća počelo razvijati i istraživati zbog sve većeg broja gmazova koji se drže kao kućni ljubimci, a time su i češći pacijenti u veterinarskim ambulancama. Izrada krvne slike gmazova je postupak koji se za sada još ne radi u kliničkoj veterinarskoj praksi, ali upoznavanjem hematologije i načinima određivanja hematoloških parametara u gmazova otvara se mogućnost i veterinarima male prakse da rutinski odrede hemogram gmazova. Svi hematološki parametri određuju se ručno, pa je za dobivanje kompletne krvne slike, osim stručnosti i iskustva osobe koja izrađuje hemogram, potrebna i odgovarajuća laboratorijska oprema i reagensi. Sve krvne stanice gmazova imaju jezgru, pa je tijekom diferencijacije stanica potreban oprez kako ne bi došlo do zamjene pojedinih vrsta stanica. Na broj i morfologiju krvnih stanica gmazova utječu brojni vanjski i unutarnji čimbenici koje treba imati na umu tijekom interpretacije dobivenih nalaza. Promjena broja i morfologije krvnih stanica tijekom različitih bolesti i patoloških stanja javlja se ovisno o vrsti gmazova, težini i dužini trajanja bolesti.

Ključne riječi: gmazovi, hematologija, promjene u hemogramu

10. SUMMARY

Haematology of reptiles is a field that began to develop and explore in recent decades due the growing number of reptiles that are kept as pets, and thus are more common as patients in veterinary practices. Making blood count in reptiles is a process which is not yet working in clinical veterinary practice, but as we learn about ways of determining hematology and hematological parameters in reptiles we make a oportunity for veterinarians of small practices to routinely determine haemogram of the reptiles. All haematological parameters are determined manually, and so to obtain a complete blood count, other than expertise and experience of the person who made haemogram, it is necessary to have laboratory equipment and reagents. All blood cells of reptiles have a nucleus so during cell differentiation we should be cautious and we have to prevent the replacement of certain types of cells. Numerous external and internal factors have an affect on the number and morphology of blood cells of reptiles and that should be kept in mind while interpreting the findings. Change in the number and morphology of blood cells during various diseases and pathological conditions are occuring depending on the type of reptiles, severity and duration of illness.

Keywords: reptiles, hematology, changes in haemogram

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 14.06.1987 godine. U Zagrebu sam završila osnovnu školu Ivana Cankara i srednju veterinarsku školu te 2007. godine upisala Veterinarski fakultet. Tokom cijelog fakultetskog školovanja sam radila poslove vezane za prehranu životinja, lijekove i antiparazitike te sam usavršavala svoja znanja o dijetetici životinja te pritom naučila komunicirati s ljudima.